

Tubulin-interaktive forbindelser: En gjennomgang av analoger av Combretastatin A-1 og A-4 og struktur-aktivitetsforhold

Masteroppgave i Farmasi

Gro Anette Dahle



Farmasøytisk Institutt

UNIVERSITETET I OSLO

Desember 2013

Tubulin-interaktive forbindelser: En gjennomgang av analoger av Combretastatin A-1 og A-4 og struktur-aktivitetsforhold

Masteroppgave i Farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk Institutt

UNIVERSITETET I OSLO

Gro Anette Dahle

Desember 2013

Veileder: Trond Vidar Hansen

© Gro Anette Dahle

2013

Tubulin-interaktive forbindelser:

En gjennomgang av analoger av Combretastatin A-1 og A-4 og struktur-aktivitetsforhold

Gro Anette Dahle

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Combretastatinene har i løpet av de siste 30 årene fått mye oppmerksomhet som potensielle anticancerlegemidler. Hensikten med denne oppgaven har vært å gi en gjennomgang av analoger av Combretastatin A-1 og A-4 og rapporterte struktur-aktivitetsforhold. Det er også gitt en oversikt over anticancerlegemidler i klinisk bruk i dag.

Forord

Først og fremst vil jeg benytte anledningen til å takke min veileder, professor Trond Vidar Hansen, for inspirerende og god veiledning, for å være tålmodig og forståelsesfull underveis og i det hele tatt ha en smittende positiv innstilling.

Takk til overingeniør Iuliana-Cezarina Johansen for alltid å være så blid og behjelpelig. Jeg vil også takke alle på legemiddelkjemigruppen, både de nåværende og de tidligere, for et sosialt og hyggelig arbeidsmiljø. Mine «gamle» medstudenter fortjener også en takk for hyggelige og lærerike samtaler og god motivering underveis. Og stor takk til Øystein, for uvurderlig datahjelp.

Til min nærmeste familie, mamma, pappa, Stine; tusen takk for god støtte gjennom hele oppgaven - en spesiell takk til mamma for all hjelp.

Sist, men ikke minst, må jeg takke Sirius for mange gode lufteturer og pauser, og Benji, Tilla og Tari for bare å være «soft and cuddly».

Oslo, desember 2013

Gro Anette Dahle

Denne oppgaven ble utført ved seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet, Universitetet i Oslo.

Liste over forkortelser

GTP – guanosintrifosfat

GDP – guanosindifosfat

SAR – Structure-activity relationship, struktur-aktivitetsforhold

TIAs – Tubulin-interactive agents, tubulin-interaktive forbindelser

VDAs – Vascular-disrupting agents, forbindelser som virker ødeleggende på eksisterende blodårer

CA-1 – Combretastatin A-1

CA-4 – Combretastatin A-4

CA-1P – Fosfatprodrug av Combretastatin A-1

CA-4P – Fosfatprodrug av Combretastatin A-4

IC₅₀ – konsentrasjon som inhiberer 50% av en gitt biologisk prosess

Innholdsfortegnelse

1	Kreft og kjemoterapi	1
1.1	Kreft.....	1
1.2	Behandling av kreft	1
1.3	Legemidler i behandlingen av kreft.....	2
1.3.1	Cytostatika.....	2
1.3.2	Andre legemidler i kreftbehandling	6
1.3.3	Kombinasjonsbehandling	6
1.4	Cellesyklus.....	7
1.4.1	Mikrotubuli.....	9
2	Tubulin-interaktive naturprodukter	11
2.1	Naturprodukter som legemidler mot kreft	11
2.2	Tubulin-interaktive forbindelser og deres virkemåte	11
3	Combretastatiner	13
3.1	Oppdagelse og identifikasjon	14
3.2	Biologiske aktiviteter av CA-1 og CA-4 og deres prodrugs	14
3.2.1	Inhibitorisk aktivitet på tubulin	14
3.2.2	Cytotoksisk aktivitet.....	15
3.2.3	Antivaskulær aktivitet	15
3.2.4	Kombinasjonsterapi.....	17
4	Analoger av CA-1 og CA-4	18
4.1	Modifikasjoner på ring A	18
4.2	Modifikasjoner på ring B.....	19
4.2.1	Combretastatin A-4	19
4.2.2	Combretastatin A-1	21
4.3	Modifikasjoner på broen.....	22
4.3.1	Analoger med 1 atom i broen.....	23
4.3.2	Analoger med 2 atomer i broen.....	23
4.3.3	Analoger med 3 atomer i broen.....	26
4.3.4	Analoger med fler enn tre atomer i broen	27
4.4	Oppsummering av SAR.....	28
4.5	Kliniske studier.....	29

5	Konklusjon	31
	Litteraturliste	33

1 Kreft og kjemoterapi

1.1 Kreft

Kreft er en samlebetegnelse på en gruppe med sykdommer som kan oppstå overalt i kroppen. Kreftceller (maligne celler) skiller seg fra normale celler ved at de er mer eller mindre selvstyrte og upåvirket av vevens fysiologiske kontrollmekanismer.¹ Cellene mister evnen til å fungere normalt, noe som kan føre til aggressiv og ukontrollert cellevekst og tumordannelse. Dette skyldes mutasjoner i gener involvert i DNA-reparasjon, apoptose og cellesyklus.² Maligne tumorer kan invadere og ødelegge omliggende vev og metastasere til andre deler av kroppen. Det grunnleggende biologiske apparatet er det samme i både maligne og normale celler, men kreftcellene ekspanderer på bekostning av de normale cellene, noe som fører til forstyrrelser i normal kroppslig funksjon og som kan føre til død.^{1,3} Kreft er den vanligste dødsårsaken i Norge etter hjerte- og karsykdommer. På verdensbasis døde 7.6 millioner mennesker av kreft i 2008, noe som tilsvarte ca 13% av alle dødsfall.⁴ Selv om tallet er forventet å øke, er det også slik at stadig flere som får behandling overlever sin kreftsykdom.⁵ Helbredelse krever at praktisk talt alle kreftceller utryddes, da selv et veldig lite antall gjenlevende maligne celler kan forårsake recidiv. Dette, i tillegg til resistensproblematikk og store bivirkninger, gjør at det hele tiden gjøres store anstrengelser for å utvikle ny terapi.¹

1.2 Behandling av kreft

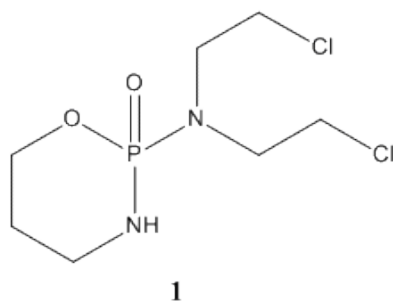
Avhengig av type kreft og om det er spredning av tumor eller ikke vurderes forskjellige behandlingsformer. Kirurgi og strålebehandling er fortsatt de mest effektive lokalbehandlingene.⁶ Det at tumorceller kan migrere til andre steder i kroppen (metastasere) øker vanskeligheten med å behandle sykdommen, da sekundære tumorer også kan gi biologisk uorden i kroppen. Under disse forholdene blir kirurgisk fjerning av tumor mindre praktisk og det blir nødvendig med andre typer behandling.³ Bruk av legemidler, kjemoterapi, blir derfor av stor betydning og i noen tilfeller den første og kanskje eneste form for spesifikk kreftbehandling. Medikamentell behandling gis også som tilleggsbehandling ved en del kreftformer, mens det i andre tilfeller ikke settes i gang med kjemoterapi før det ikke lenger er aktuelt med kirurgi eller strålebehandling.^{3,6}

Kjemoterapi er designet for å utnytte forskjellen mellom normale og maligne celler, og kreftceller avviker i en mengde forskjellige biokjemiske prosesser, spesielt i kontroll av cellevekst og celledeling. Det endelige målet er å komme frem til et legemiddel som selektivt vil ødelegge, eller ufarliggjøre, tumorceller uten en for betydelig effekt på de normale cellene.³ Cancerceller kan i mange tilfeller være mer følsomme mot cytostatika enn normale celler, men fordi bivirkninger som følge av skade på normale celler blir en begrensende faktor er spørsmålet om selektivitet så kritisk.¹ I den senere tid har man økt fokuset på studier som spesifikt retter seg mot blant annet gener, proteiner og reseptorer som regulerer vekst og overlevelse av tumor⁷, da det er nødvendig å finne mer spesifikke måter å angripe maligne tumorer på enn den klassiske behandlingen med uselektive og sterkt toksiske midler.¹

1.3 Legemidler i behandlingen av kreft

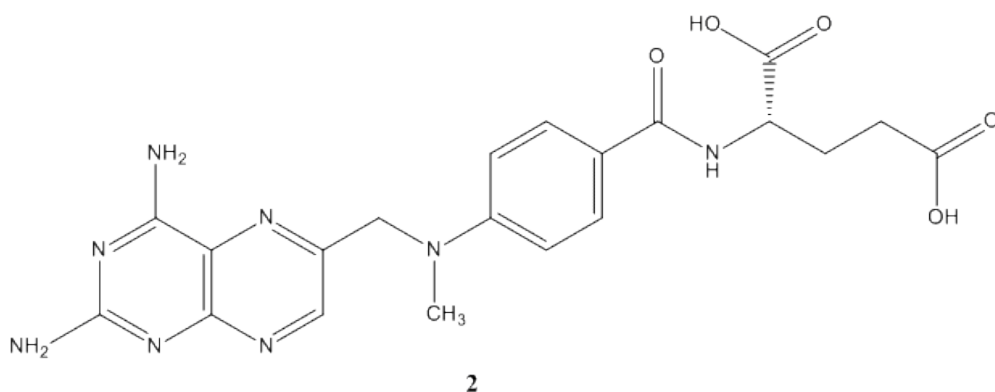
1.3.1 Cytostatika

Alkylerende cytostatika ble introdusert i kreftbehandling for mer enn 60 år siden og er sterkt reaktive og ofte elektrophile stoffer som danner kovalente bindinger med diverse elektron donorgrupper i ulike cellulære makromolekyler.⁸ Den cytotoxiske effekten skyldes i første rekke skade på DNA, med hemmet celledeling og senere apoptose. De alkylerende midlene er av de aller mest benyttede cytostatika. De enten foreligger som, eller blir omdannet til, substanser med stor reaktivitet overfor cellenes elektronrike grupper. De alkylerende midlene kan deles inn i forskjellige kjemiske grupper etter deres varierende struktur, men de har prinsipielt felles virkemåte. Blant alkylerende cytostatika finner vi sennepsgassderivater, hvor syklofosamid(**1**) har bredest anvendelse.^{8b, 8c}



Figur 1. Eksempel på alkylerende cytostatika, syklofosamid(**1**)

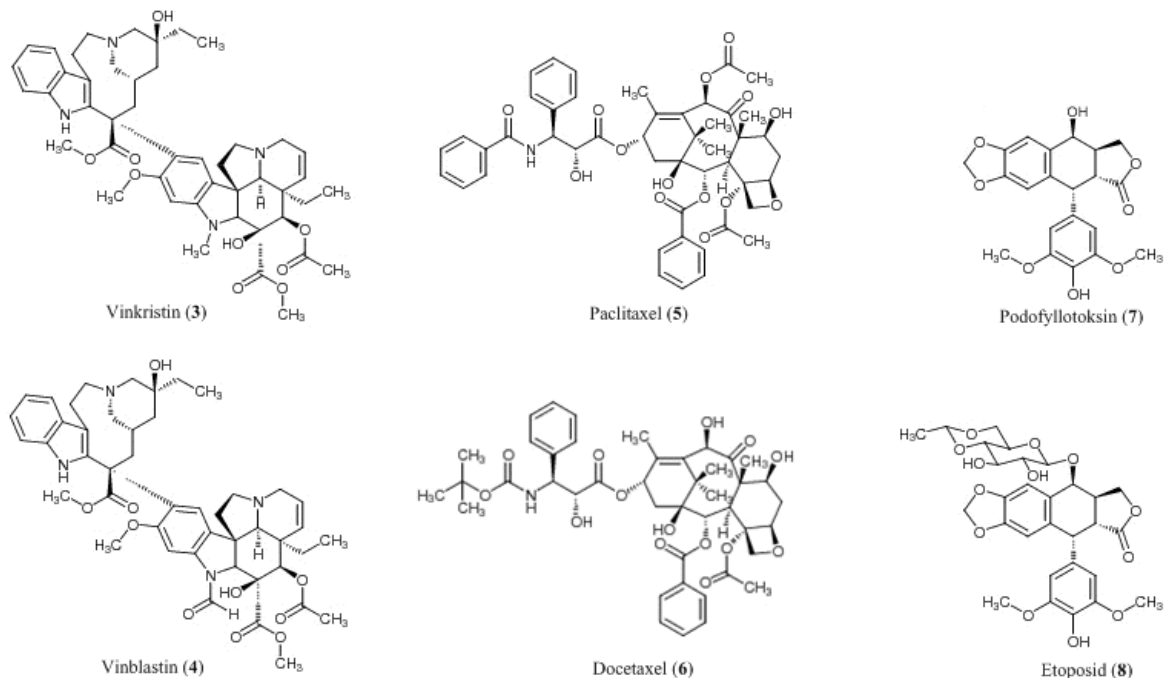
Antimetabolitter er strukturanaloger til normale molekyler som er viktige for normal funksjon av cellen. De forstyrrer reaksjonsveier som er essensielle for cellen, enten ved å reagere med bestemte enzymer og hemme deres aktivitet eller ved å virke som falske substrater som fører til dannelse av abnorme makromolekyler. Behandlingsprinsippet går tilbake til 1940-årene, men antimetabolitter spiller fremdeles en nøkkelrolle i medikamentell behandling av en rekke kreftsykdommer. De kan deles inn i folsyreanaloger, purinanaloger og pyrimidin antagonist.^{8b, 8c} Metotreksat(**2**) er et eksempel på en folsyreanalog og benyttes mot blant annet leukemi og brystkreft, i tillegg til at det i lavdose brukes antiinflammatorisk og immunsupprimerende ved blant annet noen tilfeller av psoriasis og reumatoid artritt.^{8c}



Figur 2. Eksempel på en antimetabolitt, folsyreanalogen metotreksat(**2**)

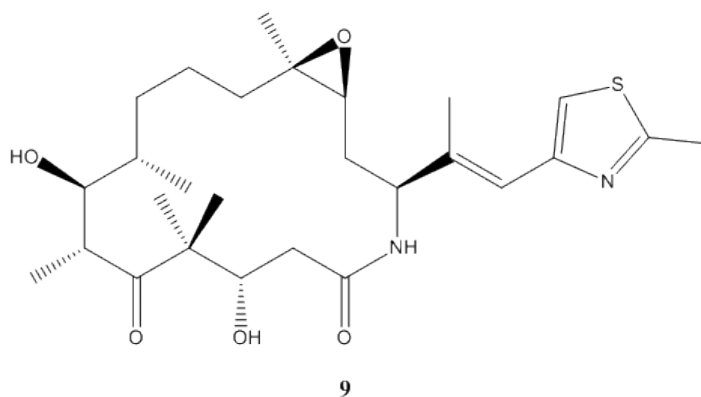
Legemidler i plantealkaloidgruppen kan deles inn i tre deler: Vinkaalkaloider, taxaner og epipodofyllotoksiner. De har stort sett virkning på mikrotubuli, men noen gjør også skade på DNA-kjeden. De antimitotiske egenskapene til vinkaalkaloidene vinkristin(**3**) og vinblastin(**4**) ble oppdaget først, og det har også blitt laget semisyntetiske derivater av disse som er i bruk mot kreft. De har felles virkningsmekanisme ved at de hindrer polymerisering av mikrotubuli og fremmer depolymerisering, noe som fører til blokade i metafasen. De har for øvrig veldig forskjellig klinisk anvendelse og bivirkninger.^{8c, 9} Combretastatinene er også forbindelser som fremmer depolymerisering av tubulin, og vil bli diskutert nærmere senere. Taxanene hemmer tubulindepolymerisering og utgjør en viktig gruppe cytostatika utviklet på 90-tallet. Paclitaxel(**5**) og derivatet docetaxel(**6**) fremstilles i dag semisyntetisk fra nålene til en barlindart langt mer utbredt enn *Taxus brevifolia*, hvor paclitaxel først ble isolert fra barken.⁹ Epipodofyllotoksiner har også virkning på mikrotubuli, men hovedeffekten kommer først og

fremst ved hemming av topoisomerase II og indusering av kjedebrudd i DNA.⁹⁻¹⁰ De er semisyntetiske derivater av podofyllotoksin(**7**) og har vært i klinisk bruk siden tidlig på 70-tallet.¹¹ Etoposid(**8**) er et eksempel på et slikt derivat.



Figur 3. Utvalgte legemidler i plantealkaloidgruppen

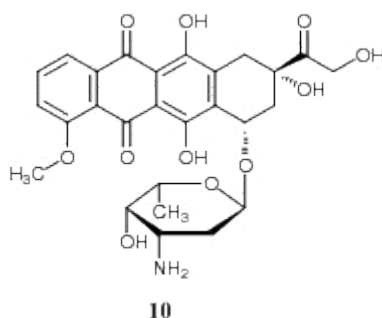
Epotiloner er sekundære metabolitter dannet av myxobakterier som ved «screening» viste antifungal aktivitet og senere også ble vist å ha en paclitaxellignende virkningsmekanisme¹² Epotiloner viste hemming av tubulindepolymerisering *in vitro* og demonstrerte antitumoraktivitet. Mange syntetiske og semisyntetiske analoger har derfor blitt laget og flere av disse har vist effekt ved behandling av tumorer resistente mot førstehandsbehandling.



Figur 4. Ixabepilone (**9**, Ixempra)

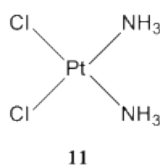
I 2007 ble laktamet ixabepilon(**9**), Ixempra, godkjent av FDA for bruk i bekjempelse av brystkreft, hvor annen behandling ikke har gitt effekt, men det er ikke i klinisk bruk i Norge. Flere epotiloner er i dag i kliniske studier.¹³

Noen antibiotika er så toksiske for animalske celler at de ikke kan brukes i behandling mot infeksjonssykdommer. De kan derimot være aktuelle som antitumormidler og kommer innunder kategorien cytotoxiske antibiotika. Denne gruppen cytostatika omfatter antracykliner og beslektede stoffer av disse, i tillegg til en heterogen gruppe med øvrige antibiotika. Antracyklinene regnes som de viktigste av de cytotoxiske antibiotika og er blant våre mest effektive antitumormidler og doksorubicin(**10**) har bredest anvendelse av disse. Antracyklinene består av en tetracyklisk ringstruktur som er koblet til en sukkergruppe, men selv om strukturene er relativt like, varierer både egenskaper og klinisk anvendelse i stor grad. De har en kompleks mekanisme for antitumoreffekt som involverer hemming av topoisomerase II, samtidig som deres tendens til å generere frie radikaler trolig også bidrar til cytotoxisiteten.^{8c, 14}



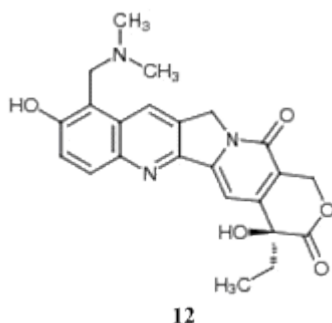
Figur 5. Doksorubicin(**10**)

Platinaforbindelser er en type cytostatika som involverer uorganiske platinakomplekser. Disse forbindelsene hydrolyseres og aktiveres i cellene og fører til skader på DNA på lignende måter som alkylerende cytostatika.^{8c} Cisplatin(**11**) var den første tungmetallforbindelsen som viste sikker klinisk effekt ved behandling av kreft.¹



Figur 6. Cisplatin(**11**)

Kamptotecin ble utvunnet fra det kinesiske treet *camptotheca acuminata* og derivater av dette, eksempelvis topotekan(**12**), brukes i dag i kreftbehandling. Kamptoteciner induserer apoptose ved å hemme topoisomerase I og skader derved DNA.¹⁰



Figur 7. Topotekan(**12**)

Det finnes også mange andre cytostatika og antitumormidler som ikke faller inn under noen gruppe, og med andre virkningsmekanismer enn nevnt her. Da cytostatika som kjent har en del bivikninger kreves det i noen tilfeller legemidler som motvirker toksisitet av cytostatika, blant annet Mesna og Rasburikase.^{8c}

1.3.2 Andre legemidler i kreftbehandling

Det forskes kontinuerlig for å finne effektive legemidler mot kreft, og det utvikles nå en rekke såkalte målrettede kreftmidler, som i første rekke er legemidler som griper inn i cellenes signaloverførende reguleringsmekanismer. De består stort sett av proteinkinasehemmere, som er hemmere av tyrosin kinase og andre proteinkinaser, og andre signalhemmere. Brukes blant annet som behandling mot forskjellige typer leukemi, ikke-småcellet lungekreft, metastatisk brystkreft og nyrekreft.

Andre legemidler i bruk i kreftbehandling i dag er monoklonale antistoffer, aromatasehemmere, midler til fotodynamisk terapi, hormoner og hormonantagonister for å nevne noen.^{8c, 15}

1.3.3 Kombinasjonsbehandling

Det å kombinere flere cytostatika under intens behandling er et helt dominerende prinsipp i dagens behandlingsregimer. At kombinasjonsterapi er effektivt er dokumentert både

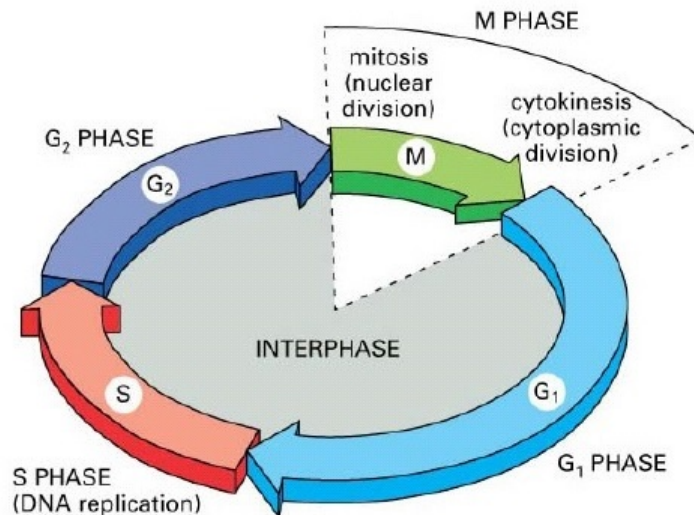
eksperimentelt og klinisk. Man kan oppnå additiv eller kanskje også synergistisk effekt ved å kombinere medikamenter med ulike virkningsmekanismer. Terapien kan også optimaliseres ved å angripe maligne celler med flere stoffer som har ulike toksisiteter på normale vev, slik at man kan oppnå mindre bivirkninger i forhold til effekt. Det er også mindre sannsynlig at en celle skal utvikle resistens mot to eller flere medikamenter samtidig, da flere celler vil dø før de rekker å bli resistente.¹

1.4 Cellesyklus

Celler blir generert fra celler, og den eneste måten å danne flere celler på er ved deling av de cellene som allerede eksisterer.¹⁶ Ukontrollert celleproliferasjon er et kjennemerke på kreft, og tumorceller har som regel ervervet skade på gener som direkte regulerer cellesyklus.¹⁷

Hver celledeling markerer begynnelsen – og slutten – på cellesyklus. Dette er en kjede av hendelser som sikrer at hver dattercelle vil arve en kopi av hvert kromosom. Den mest grunnleggende funksjonen til cellesyklus er at DNA blir riktig replikert en gang og nøyaktig dele de to kopiene i to genetisk identiske datterceller. Det er disse prosessene som definerer de to viktigste fasene i cellesyklusen.¹⁶⁻¹⁸

Før en celle kan dele seg, må den kopiere alt sitt DNA. Dette skjer i S-fasen i cellens livssyklus, også kalt syntesefasen. Etter denne fasen segregeres kromosomene og celledeling skjer i M-fasen, som er mitosen og cytokinesen. De fleste celler trenger mye mer tid til å vokse og doble proteiner og organeller i cellen enn de trenger til å replikere DNA og dele seg. Delvis for å få mer tid til vekst, finnes det ekstra mellomfaser, «gap-faser», i de fleste cellesyklus – en G_1 -fase mellom M- og S-fasen og en G_2 -fase mellom S-fasen og mitosen, som vist i figur 8. G_1 , S og G_2 -fasene utgjør til sammen interfasen.^{16, 18}



Figur 8. Illustrasjon av de fire fasene i cellyklus. Hentet fra referanse ¹⁹

Men de to G-fasene er ikke der bare for å forsinke celleveksten. De gir også cellen tid til å monitorere det indre og ytre miljøet for å sikre at vilkårene for celledeling er passende og at alle forberedelser er gjort før cellen setter i gang med S-fasen eller mitosen. G₁-fasen blir spesielt viktig, da beslutningen om å starte celledeling oppstår når cellene passerer et forpliktelsespunkt sent i G₁-fasen. Etter dette punktet blir de resistente mot ekstracellulære vekstregulatoriske signaler.¹⁷

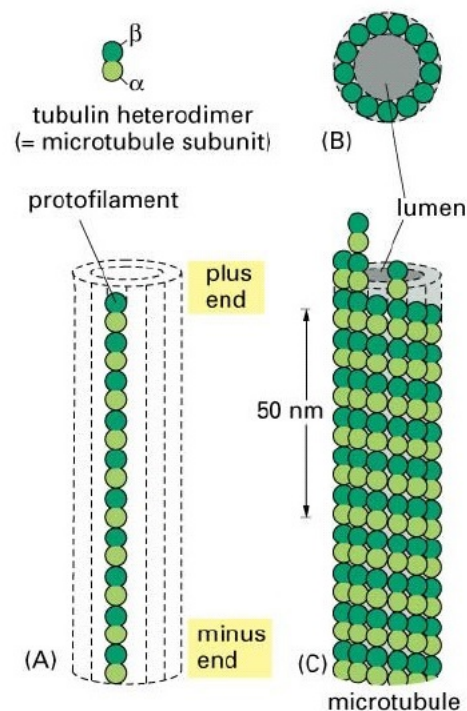
De fem første trinnene i M-fasen utgjør mitosen, mens cytokinesen skjer i det sjette trinnet som overlapper med siste del av mitosen. Mitosens fem trinn – profase, prometafase, metafase, anafase og telofase – skjer i en streng rekkefølge av sekvenser, mens cytokinesen begynner i anafase og fortsetter gjennom telofasen.²⁰

Centrosomet i en prolifererende celle duplikeres i interfase som forberedelse til mitose og i G₂-fasen begynner centrosomet å danne to poler i cellen.^{16, 20} I de fleste eukariotiske celler er centriolepar assosiert med centrosomet og organiserer veksten av mikrotubuli. I løpet av profase blir de replikerte kromosomene mer kompakte i takt med reorganisering av cytoskjelettet. Under prometafasen åpnes kjernen slik at kromosomene kan festes til spindelapparatet som dannes av mikrotubuli som strekker seg mellom de to polene. I metafasen blir kromosomene innrettet i et plan mellom de to polene av den mitotiske spindelen og i anafase blir mikrotubuli kortere og polene beveger seg fra hverandre slik at datterkromosomene blir segregert til hver sin pol. Under telofasen dannes en ny kjerne rundt

hver av dattercellene, cytokinesen blir fullført og M-fasen er avsluttet.^{16, 20} Det at dette foregår i alle typer celler, både normale og kreftceller, gjør det vanskelig å påvirke kreftcellene selektivt.³

1.4.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli er dynamiske rørformede strukturer bygget opp av tubulinsubenheter. Tubulin er byggesteinen i mikrotubuli, og i hver celle med kjerne i kroppen finnes to nært beslektede globulære proteiner, α - og β - tubulin. Disse to proteinene blir bundet sammen av ikke-kovalente bindinger og danner en α - β heterodimer. Disse heterodimerene kan arrangeres «hode mot hale» og gi lange proteinfibre bestående av vekslende α - og β -tubulin, kalt protofilamenter. En mikrotubuli består av 13 slike protofilamenter som grupperes sammen og danner en hul, sylinderformet struktur.^{3, 21}



Figur 9. Oppbygning av mikrotubuli og dets subenheter. Hentet fra referanse²²

Hver av monomerene har et bindingssete for guanosintrifosfat (GTP). GTP som binder seg på β -tubulin er utskiftbar og kan hydrolyseres til GDP, noe som har en viktig effekt på de

dynamiske egenskapene til mikrotubuli. Det GTP-molekylet som binder seg til α -tubulin monomeren blir ikke hydrolysert eller byttet ut og kan ses på som en del av tubulinheterodimerstrukturen. For når mikrotubuli er dannet er ikke disse komplekse proteinrørene statiske. Protofilamentet har en strukturell polaritet og mikrotubuli vokser ved å addere tubulinheterodimerer til pluss-enden (β -tubulin). De har en dynamisk struktur og polymeriserer når de trengs i cellen, og depolymeriserer når de ikke lenger behøves.^{3, 21}

Mikrotubuli har en rekke funksjoner, som nevnt danner de den mitotiske spindelen som ved celledeling er nødvendig for forflytning av kromosomene til polene til den nye cellen. De utgjør også cytoskjelettet i cellen sammen med actinfilamentene og de intermediære filamentene og er med på gi cellen form og struktur. Dette gjør at de er nødvendige for å ivareta vekst og funksjon både hos normale og maligne celler.²¹

2 Tubulin-interaktive naturprodukter

2.1 Naturprodukter som legemidler mot kreft

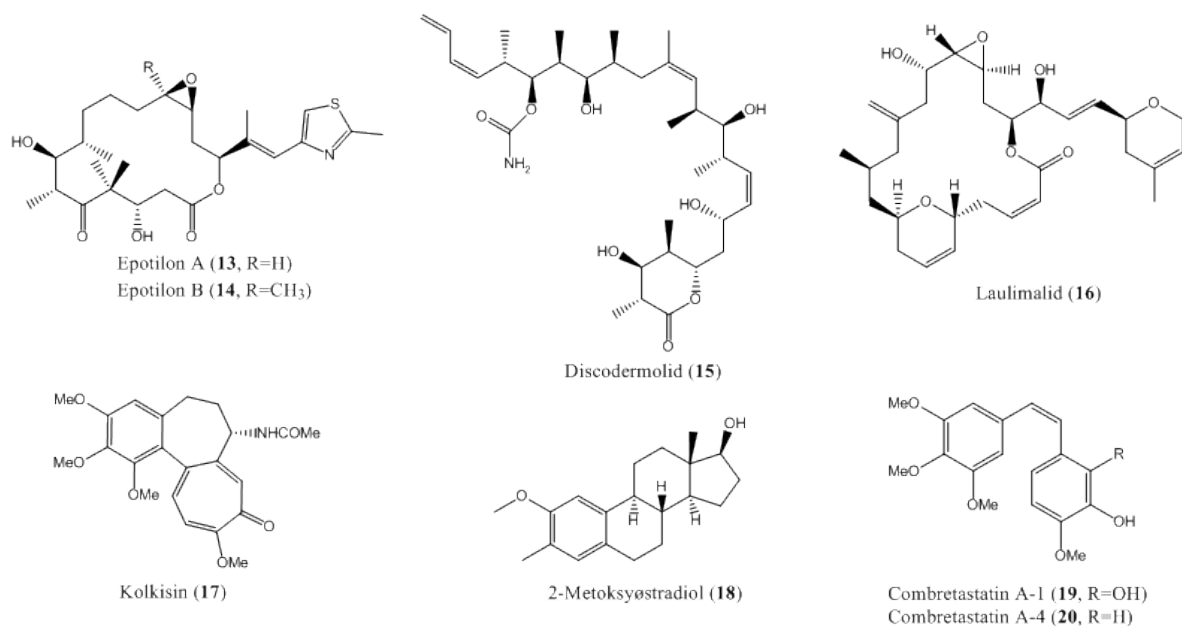
Naturprodukter er hovedkilden med tanke på anticancerlegemidler og det har lenge vært brukt planter som et ledd i behandlingen mot kreft.²³ En studie utført av Cragg m.fl.²⁴ i 2008 og som omhandlet 1024 nye kjemiske forbindelser, viste at 67% av disse formelt var syntetiske. Men av disse var 18% syntetiske forbindelser med en farmakofor fra et naturprodukt og 13% etterlignet et naturprodukt med inhibitorisk virkning på det molekylære interressetarget. Så kun 37% var rent syntetiske. For anticancerforbindelser var andelen som stammet fra eller var inspirert av naturprodukter nær sagt 80%. Analysen viste at naturprodukter gir verdifulle bidrag ikke bare som potensielle kjemoterapeutiske forbindelser, men også som utgangsmolekyler, «lead compounds», som kan være grunnlag og inspirasjon for semisyntese og total syntese av nye effektive legemidler.

Naturproduktene kan være strukturelt komplekse og har blitt utvalgt gjennom evolusjon for å binde seg til biologiske makromolekyler og representerer derfor en gruppe «privilegerte strukturer», som er gode modeller for syntese av nye, biologisk aktive, naturproduktlignende molekyler. Men selv om naturprodukter viser effektiv og selektiv biologisk aktivitet har de ikke undergått denne evolusjonelle seleksjonen for å passe som legemidler for mennesker. Disse naturproduktene kan virke som «lead compounds» for utvikling av analoger generert ved kombinatorisk biosyntese og/eller kombinatorisk kjemi, med forbedrede farmakologiske egenskaper. For å få riktig potens og effekt, selektivitet og farmakokinetiske egenskaper kreves det ofte modifisering, fjerning eller introduksjon av funksjonelle grupper eller stereosentre, men også for å øke fysiokjemiske og farmakokinetiske egenskaper.²⁴

2.2 Tubulin-interaktive forbindelser og deres virkemåte

Antimitotiske forbindelser viser strukturelt stor variasjon, selv blant forbindelser som interagerer i samme bindingsområde på tubulin. De representerer naturprodukter innhentet fra en rekke organismer, syntetiske forbindelser og syntetiske analoger av disse. Tubulin-interaktive molekyler (TIAs) kan deles inn i om de induserer eller inhiberer tubulin dannelsen

og noen strukturer er vist i Figur 10.²⁵



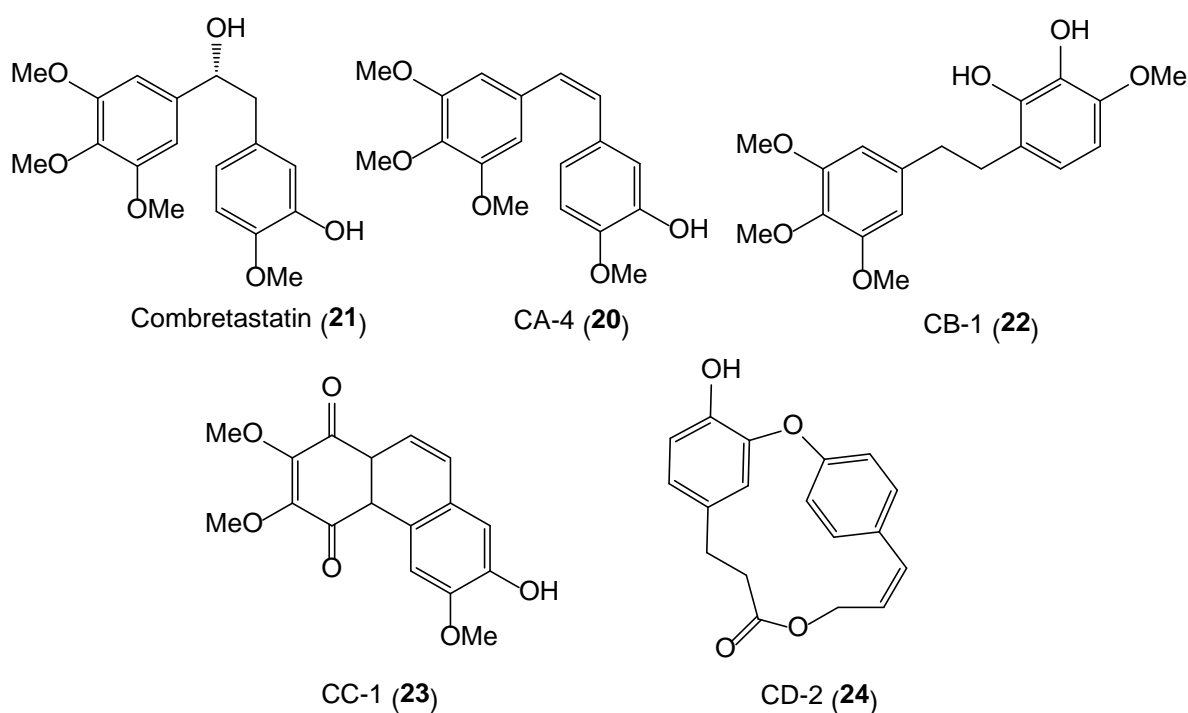
Figur 10. Utvalgte tubulin-interaktive forbindelser

Det er flere kjente bindingssteder på tubulin: taxol-setet, laulimalid-setet, vincadomenet og kolkisin-setet. Forbindelser som binder seg til taxoid- eller laulimalid-setet fremmer dannelsen av tubulin. Best beskrevet av de to bindingssetene er taxoid-setet, hvor blant annet paclitaxel(5), epotilon A(13) og B(14) og discodermolid(15) binder seg. Laulimalid(16) er vist at binder seg på et annet sete enn taxoid-setet. Forbindelser som binder seg til vincadomenet og kolkisin-setet hemmer mikrotubulindannelsen. Noen av naturproduktene som binder seg i vincadomenet er vinblastin(4) og vincristin(3), og som også var de første naturproduktene som kom ut i klinisk bruk.²⁵ I motsetning til de tidligere nevnte strukturene har forbindelsene som binder seg til kolkisin-setet en tendens til å ha relativt enkle strukturer, og forbindelser som binder seg her er kolkisin(17), podofyllotoksin(8), 2-metoksyøstradiol(18) og noen av combretastatinene, for eksempel 19.²⁴⁻²⁶ Bruk av kolkisin i kreftbehandling blir hindret pga. dets toksisitet, men det er i bruk mot blant annet akutte anfall av urinsyregikt.^{3, 27} Det har også blitt benyttet mot familiær middelhavsfeber og leverchirrhose.²⁸

TIA-s klassifiseres som enten hemmere eller indusere av tubulinpolymerisering, da de har motsatt effekt ved høy konsentrasjon, men ved lave konsentrasjoner viser de en felles effekt hvor de undertrykker mikrotubulidynamikk. Dette forklarer forskjellen i konsentrasjon som utløser endringer i polymerisering av mikrotubuli og konsentrasjonen som hemmer cellevekst.²⁹

3 Combretastatiner

Combretastatiner har på grunn av deres enkle struktur og interessante anticanceregenskaper mottatt mye oppmerksomhet, spesielt siden de i tillegg til cytotoksisitet også viser antivaskulære egenskaper.³⁰ Combretastatinene deles inn i A, B, C og D-serier etter deres strukturelle karakteristikk. A-serien består av *cis*-stilbener, B-serien av dihydrostilbener, C-serien av quinoner og D-serien omhandler makrosykliske laktoner.³¹ Figur 11 viser en oversikt over utvalgte combretastatiner.



Figur 11. Combretastatin (21) og utvalgte strukturer fra henholdsvis A(20), B(22), C(23) og D(24)-seriene.

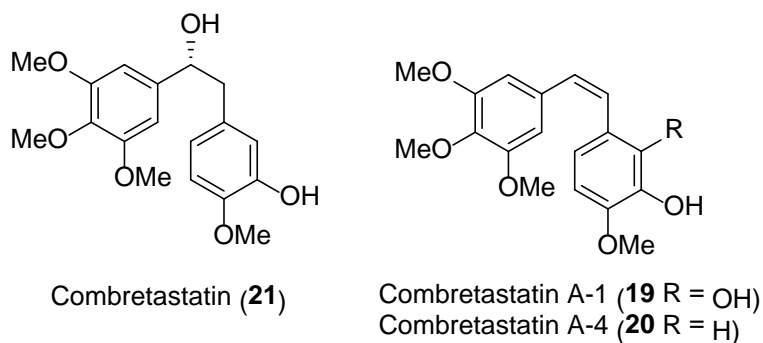
Combretastatin A1(19) og dets nært beslektede analog combretastatin A4(20) er de mest studerte forbindelsene i denne gruppen, og viser både potent cytotoksisitet og er potente hemmere av tubulindannelse.^{30a} Fosfat-prodrugs av disse har allerede entret flere kliniske studier som anticancerlegemidler.³² Det er problemer knyttet til combretastatinene da de har lav vannløselighet og biotilgjengelighet. De kan isomerisere fra *cis* til *trans*, samt at de kan danne ringslutning slik at det dannes fenantrener, noe som reduserer aktiviteten.³³

Studier viser at combretastatin A-4(CA-4) har en høy cytotoksisk effekt mot flere humane kreftcellerlinjer, inkludert noen multidrug resistente cellerlinjer, hvor den cellulære pumpen

ikke gjenkjenner CA-4. CA-4 inhiberer i tillegg angiogenese, som er en nødvendighet for vekst av store tumorer. CA-4 ødelegger angiogenetiske kar og dette fører til apoptose av disse endotelcellene.^{3, 34}

3.1 Oppdagelse og identifikasjon

Combretastatinene er en gruppe naturprodukter som først ble isolert fra grener, blader og frukt fra det sør-afrikanske treet *Combretum caffrum* av Pettit m.fl. i 1982. Det var kjent at pulver fra rotbarken på *C. caffrum* ble brukt som et «Zulu heksebrygg» for å skade fiender. Den første isolerte forbindelsen med biologisk aktivitet fra dette treet var combretastatin **21**.³⁵ Combretastatin A-1(**19**) ble isolert fra barken til *C. caffrum* av Pettit m.fl. i 1987 og combretastatin A-4(**20**) i 1988.³⁶



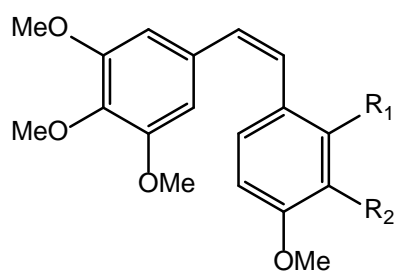
Figur 12. Combretastatin (**21**), Combretastatin A-1(**19**) og A-4(**20**)

3.2 Biologiske aktiviteter av CA-1 og CA-4 og deres prodrugs

Selv om combretastatinene var interessante på grunn av sine inhibitoriske aktiviteter på tubulin, har det også i senere tid blitt vist mer interesse for deres evne til å selektivt ødelegge blodårer i tumor. Det er denne evnen som det i dag er mest fokus på, og derfor undersøkes nå denne effekten brukt i kombinasjon med andre terapiformer.

3.2.1 Inhibitorisk aktivitet på tubulin

Det har blitt syntetisert fosfat-prodrugs av både CA-1 og CA-4, henholdsvis CA-1P(**25**) og CA-4P(**26**), for å øke vannløseligheten. Disse «prodrugs» blir *in vivo* defosforylert av uspesifikke endogene fosfataser.³⁷



CA-1P, OXi4503 $R_1 = R_2 = \text{PO}_3\text{Na}_2$ (**25**)
 CA-4P, ZybrestatTM $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{PO}_3\text{Na}_2$ (**26**)

Figur 13. Fosfatprodrugs av CA-1 og CA-4, henholdsvis CA-1P(**25**) og CA-4P(**26**).

De defosforylerte forbindelsene, CA-1 og CA-4, binder seg deretter ved eller i kolkisinbindingssetet på β -tubulin og inhiberer tubulinpolymerisering/mikrotubulidannelse.^{33b, 37-38}

3.2.2 Cytotoksisk aktivitet

Det er vist at CA-4P stanser cellene i G_2/M -fasen av cellyklus.^{38b} Studier av CA-4 viser sterk cytotoksisk effekt mot flere kreftcellelinjer, både humane og multidrug resistente cellelinjer,^{3, 34a, 39} med IC_{50} -verdier i nanomolarområdet.^{33b, 36a, 39} CA-1 derimot, viste en stor grad av kryssresistens, muligens på grunn av økt affinitet for «drug-efflux» prosesser i de resistente cellene.³⁹

3.2.3 Antivaskulær aktivitet

For at en tumor skal kunne vokse utover $1\text{-}2\text{mm}^3$ er den avhengig av tilstrekkelig blodforsyning. Angiogenese er derfor essensielt for vekst og metastasering av større tumorer.⁴⁰

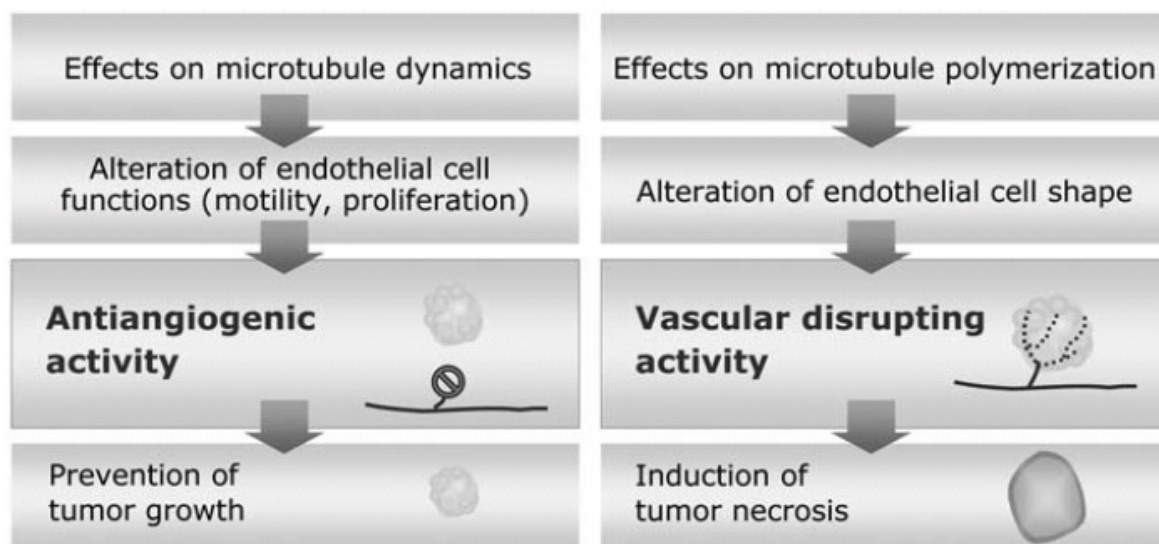
CA-4 var det første depolymeriserende tubulin-interaktive molekylet som viste ødeleggende aktivitet på blodkar i endotel tilknyttet tumor ved godt tolererte doser. Disse potente og selektive antivaskulære effektene ble sett ved mindre enn en tidel av maksimum tolererte dose (MTD) og har et bredt terapeutisk vindu.⁴¹

Siden kreftceller er avhengige av god blodforsyning for å kunne danne større tumorer, kan den antivaskulære aktiviteten til tubulininteragerende forbindelser utgjøre en fremgangsmåte for å bekjempe kreft. Det har blitt foreslått to hovedanvendelser av forbindelser som virker på

mikrotubuli. Molekyler som bindes til tubulin kan hindre dannelse av nye blodårer ved å inhibere trinn i angiogenesen, eller de kan virke ødeleggende på allerede eksisterende blodårer i tumor. Den siste gruppen kalles «vascular disrupting agents» (VDAs).^{40b}

VDAs kan deles inn i to grupper, de som bruker antistoffer og peptider for å levere virkestoff til tumorendotel og de som utnytter de karakteristiske forskjellene mellom tumor- og normalvaskulatur. Den siste gruppen er VDAs med lav molekylvekt og inkluderer tubulininteraktive depolymeriserende forbindelser, med CA-4 som lead compound.⁴¹ CA-4s mer vannløselige prodrug, CA-4P, var den første av disse forbindelsene til å entre kliniske studier, og er det VDA blant de tubulininteragerende forbindelsene som er mest studert.⁴² CA-1P har vist seg å ha en mer potent vaskulær effekt enn CA-4P i tumormodeller *in vivo*.⁴³

Forbindelser som interagerer med tubulin kan virke både antiangiogenetiske og som VDAs. Ved å endre dynamikken i mikrotubuli kan de påvirke endotelcellefunksjoner som er essensielle i den angiogenetiske prosessen, noe som fører til hemming av tumorvekst. Effekten de har på organisering av mikrotubuli fører til ødeleggelse av blodforsyningen i tumor og induserer tumornekrose.^{40b, 41}



Figur14. Illustrasjon av hvordan TIAs kan virke som antiangiogeniske forbindelser og/eller VDAs. Hentet fra referanse^{40b}

3.2.4 Kombinasjonsterapi

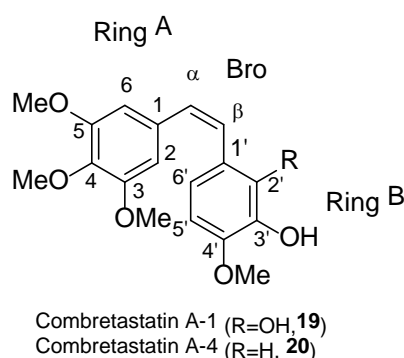
Studier har vist at CA-4P og CA-1P kun fører til moderat hemming av tumorvekst.

Histologiske analyser har vist at opptil 80-90 % av tumormassen kan bli nekrotisk bare få timer etter administrering av en enkel CA-4P-dose.⁴⁴ Karakteristiske kjennetegn for slike VDAs er reduksjon i blodforsyning i tumor, induksjon av tumornekrose, sekundær celledød i tumor på grunn av iskemi og tilstedeværelsen av overlevdende kreftceller i ytterkanten av tumor. Siden cellene i tumorperiferien hovedsaklig får sin næring gjennom omkringliggende blodårer fra normalt vev blir det igjen en livsdyktig ytterkant med kreftceller etter behandling med disse forbindelsene. Som et resultat av dette er det ikke sannsynlig at administrering av VDAs alene vil være kurerende. Det er enighet om at disse agents vil ha størst nytte i kombinasjon med konvensjonell kreftbehandling og det har derfor vært stor interesse for å evaluere effekten av disse forbindelsene når de blir kombinert med tradisjonell anticancerbehandling.⁴³⁻⁴⁴

4 Analoger av CA-1 og CA-4

Den relativt enkle og karakteristiske grunnstrukturen til combrestatinene, i tillegg til enkle syntesemetoder og det store registeret av ulike synteseveier for å danne stilbenoider, har ført til omfattende SAR-studier rundt disse. Et stort utvalg av forbindelser har blitt syntetisert for å etterligne struktur og effekt av combretastatinene, da spesielt av CA-4 og CA-1.²⁶ Det er ikke mulig å få med alle combretastatinanalogene i denne oppgaven, da de finnes i stort antall, men en liten oversikt vil bli gitt her.

Selve combretastatinstrukturen kan deles inn i tre deler – en A-ring, en B-ring og en bro som linker de to ringene. Det har blitt lagt mye arbeid i modifikasjon av combretastatinstrukturen for å få en bedre forståelse av struktur-aktivitets forhold og for å komme frem til nye, potente analoger.^{26, 45}

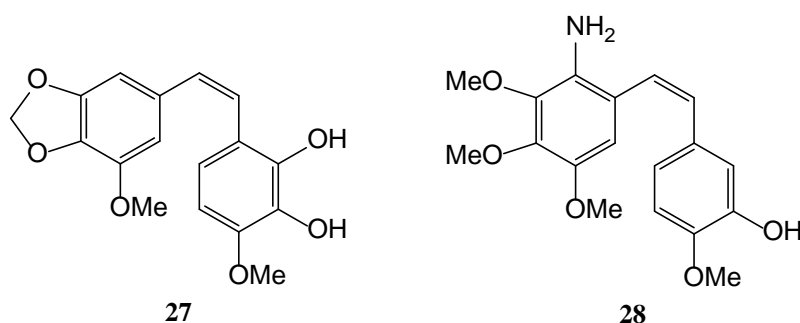


Figur 15. De forskjellige delene av combretastatin A-1(**19**) og A-4(**20**)

4.1 Modifikasjoner på ring A

Basert på kjente SAR-data er det relativt få forskningsgrupper som har gjort forsøk på endringer på ring A, da 3-,4-,5-trimetoksyfenylenheten fremstår som svært nødvendig for best cytotoxisk aktivitet.^{33b, 46} Noen unntak finnes, og det er vist at ved å bytte ut trimetoksyfenylenheten med en trimetylphenylenhet, eller metoksygruppen i 3-posisjon med et halogen (F, Br, Cl) blir tubulinhemmende aktivitet beholdt, mens cytotoxisiteten blir redusert.^{46d, 47} Metoksygruppene er også byttet ut for å danne et trifluorostilbenoid, uten forbedring av effekt.^{46d} Substitusjon av to av de vicinale metoksygruppene med en

metylendioksybro har blant annet ført til Stilstatin 1(**27**), vist i figur 16, men sammenlignet med CA-1 er cytotoxissiteten redusert, selv om det fortsatt viser potent tubulinhemming.^{33b}



Figur 16. Eksempel på analoger med modifikasjon på A-ringen

En polar aminogruppe satt inn i 2-posisjon på CA-4 har gitt en analog(**28**) som har vist potent cytotoxissitet og tilsvarende tubulinhemmende aktivitet som CA-4.⁴⁸ Hele trimetoksyfenylenheten har også vært substituert med andre ringsystemer, blant annet furan og indolderivater,⁴⁹ uten at det har resultert i økt aktivitet.^{46e, 49a, 50}

4.2 Modifikasjoner på ring B

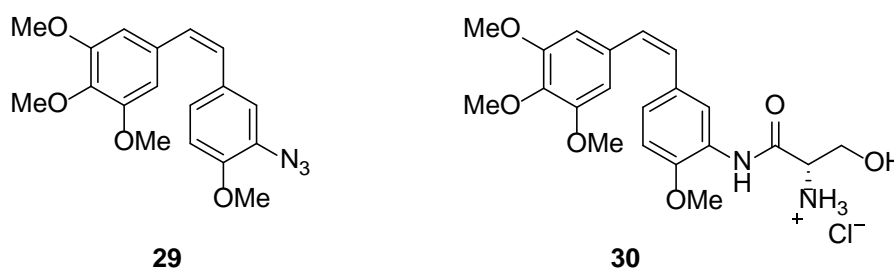
4.2.1 Combretastatin A-4

Mange studier har vist at 4'-metoksygruppen er viktig for optimal cytotoxisk aktivitet, men ikke nødvendigvis for inhibitorisk aktivitet på tubulin.^{46b, 46d, 46f, 48, 51} Om man substituerer 4'-metoksygruppen med en metyl-, klor- eller dimetylaminogruppe får man forbindelser med potent tubulinhemmende aktivitet, men redusert cytotoxissitet.^{46b, 46f}

Det har blitt undersøkt effekten av 3'-hydroksygruppen sammenlignet med analoger hvor denne substituenten ikke var til stede, og det var ikke alltid man kunne observere noen signifikant forskjell i potens.⁵² 3'-hydroksygruppen er altså ikke nødvendig for potent aktivitet, og fjerning av hydroksylgruppen på CA-4 førte kun til litt redusert aktivitet.^{46f} Men om det skulle være en forskjell var det alltid den 3'-hydroksysubstituerte forbindelsen som viste høyest aktivitet.⁵² Forbindelser som er mest lik CA-4, altså de med en metoxylgruppe i *para*-posisjon sammen med en hydroksylgruppe i *meta*-posisjon, har i mange tilfeller vist seg å være de mest potente derivatene.^{46a, 52-53} Det er også undersøkt effekten ved substitusjon av

alkylgrupper i 3'-posisjon, hvor (E)-arylalkenanalogene generelt sett viste bedre cytotoxiskitet i forhold til de enkle O-alkylderivatene.⁵⁴

Nitrogenmodifiserte analoger med blant annet en azidgruppe i 3'-posisjon viste sterk hemming av tubulinaktivitet, med azidanalogen nesten like potent som CA-4. 3'-azidocombretastatin(**29**) viste også stor cytotoxisk aktivitet.⁵⁵ 3'-hydroksygruppen har også blitt substituert med en aminogruppe, noe som har gitt analoger med potent cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet – cytotoxiskiteten har også i noen tilfeller vært forbedret.^{46a, 51c, 53d, 55-56}



Figur 17. Struktur av noen nitrogenmodifiserte analoger

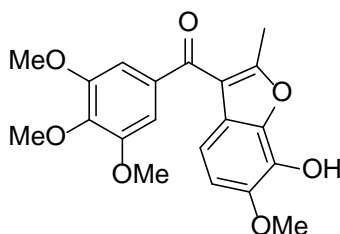
Serinamidanalogen **30**, AVE8062 (Ombrabulin), har også vist potent tubulinhemmende og cytotoxisk aktivitet og har blitt utprøvd i fase I/II-studier.^{56f, 57} Substitusjon med nitrogrupper i 3'-posisjon viste derimot som regel redusert aktivitet i forhold til tilsvarende aminoanalog.^{46a, 46i, 53d, 55, 56c, 58} Det samme gjorde 4'-nitrogenmodifiserte analoger, som også viste dårligere inhibitorisk aktivitet på tubulin.⁵⁵

Økt inhibering av tubulinpolymerisering sees også med analoger som har fluor substituert i 3'-posisjon, men det reduserer cytotoxiskitet.^{46d, 59} I en studie hvor borsyre ble benyttet som en isoster for den aromatiske 3'-hydroksygruppen, var analogen en mer potent tubulinhemmer enn CA-4 og viste potent cytotoxiskitet.⁶⁰

Heterosykliske analoger av CA-4 har også blitt laget, hvor indol eller benzothiofen har erstattet B-ringene, men disse var mye mindre aktive sammenlignet med CA-4.⁶¹

En benzofurananalog, BNC105(**31**), har vist god tubulinhemmende aktivitet og cytotoxiskitet sammenlignet med CA-4. Videre undersøkelser har vist at både en C7-OH og en C2-

substituent er nødvendig for best mulig aktivitet.⁶² B-ringene har også blitt substituert med en naftylengruppe, men at dette også gav lavere effekt enn CA-4 selv.^{46h}



31

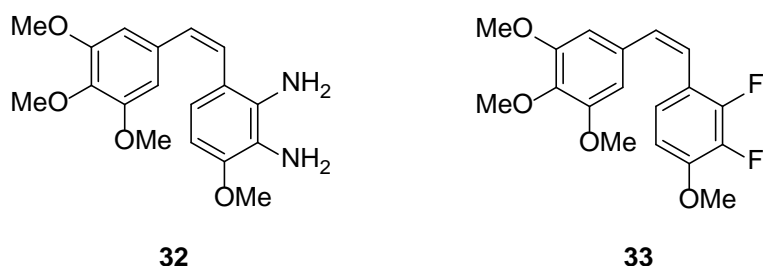
Figur 18. Benzofurananalogen **31**, BNC105

En serie analoger hvor B-ringene er skiftet ut med et stereoidskjelett er også syntetisert, hvor den beste analogen viste moderat cytotoxiskitet i brystkreftcellelinjer og potent tubulinhemmende effekt.⁶³

4.2.2 Combretastatin A-1

Av rapporterte analoger har en god del et hydrogen i 2'-posisjon, men noen analoger har andre substituenten i denne posisjonen og vil derfor regnes som analoger av CA-1. Analogene med en 2'-aminogruppe viser potent cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet, men cytotoxiskiteten reduseres dersom det introduseres ytterligere aminosubstituenten i 5' og 6'-posisjon eller nitrogrupper i 2', 5' og 6'-posisjon.^{48, 64}

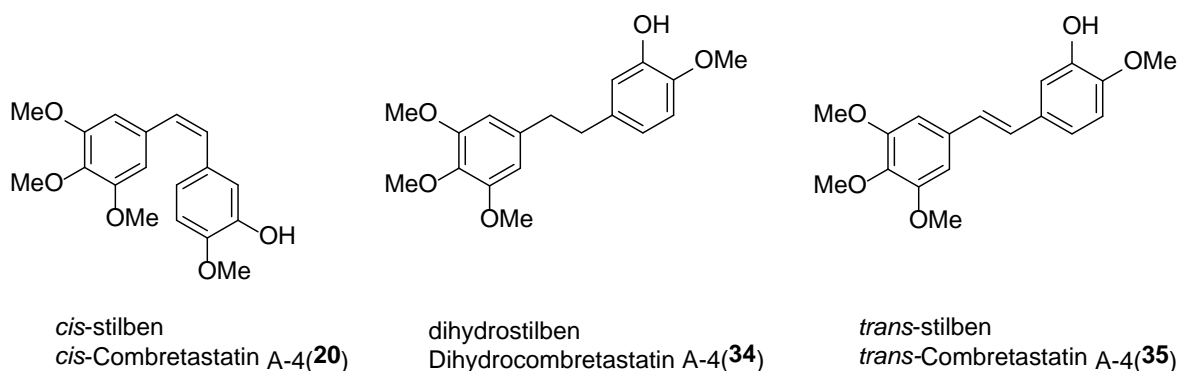
Sammenlignet med CA-1 viser en 2',3'-diaminosubstituert analog(**32**) lignende tubulinhemmende aktivitet og bemerkelsesverdig cytotoxiskitet.⁶⁵ Det er antatt at 2',3'-diaminoanalogene kan danne et *ortho*-diimin tilsvarende *ortho*-quinonderivatet av CA-1 og som hevdes å gi et stort bidrag til anticanceraktiviteten og som er vist å føre til selektiv avstengning av blodgjennomstrømming i tumor.⁶⁵ En annen analog som er mye mer cytotoxisk enn CA-1 er en 2',3'-difluoroanalog(**33**), som økte inhibering av cellevekst 16 ganger i K562-cellelinjer sammenlignet med CA-1, men var likevel mindre potent sammenlignet med CA-4.^{59a} En 2'-klorsubstituert analog viste redusert cytotoxiskitet, men bevarte tubulinhemmende aktivitet.^{46f}



Figur 19. Eksempler på CA-1 analoger med modifikasjon på B-ring

4.3 Modifikasjoner på broen

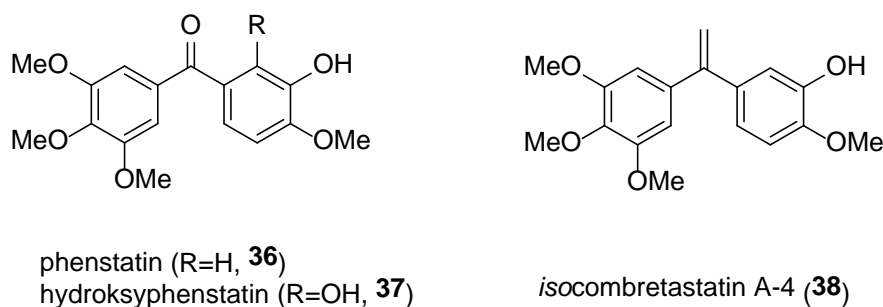
Et stort antall analoger med endringer på broen har blitt rapportert, mange med flere modifikasjoner samtidig, eksempelvis både på ring B og på broen, og det har blitt syntetisert og utført biologiske studier på en rekke av disse. Brolengden ser ut til å være vesentlig for både cytotoxisitet og tubulinhemming når det sammenlignes analoger med samme substitusjonsmønster som CA-4. 2 atomer i broen viser best aktivitet, etterfulgt av analoger med 1 og 3 atomer. 4 atomer i broen reduserer potensen ytteligere, mens en analog uten bro er lite aktiv.⁶⁶ Denne rekkefølgen kan endre seg etter som substitusjonsmønsteret på ringene endres, og det finnes flere eksempler på aktive analoger som har en annen brolengde enn 2 atomer.^{46b, 52, 53b, 66} Fenantrener og fenantrenlignende strukturer viser også redusert inhibitorisk effekt på cellevekst og tubulinpolymerisering.^{33b} Konversjon fra *cis* til *trans* reduserer generelt sett cytotoxisiteten, det samme gjør saturasjon av olefinbroen.^{33b, 46b, 46d, 46f, 47, 50, 67} Som regel synker tubulinhemmende aktivitet i følgende rekkefølge: *cis*-stilben > dihydrostilben > *trans*-stilben.^{46b, 46f, 58, 68}



Figur 20. *Cis*-(**20**) og *trans*-Combretastatin A4(**35**) og korresponderende dihydrostilbenanalog(**34**)

4.3.1 Analoger med 1 atom i broen

Blant disse analogene finner man *isocombretastatinene* og *benzophenonene* (figur 21), som har vist lignende cytotoxisk aktivitet sammenlignet med sine respektive combretastatiner. Phenstatin er navnet på benzophenonanalogen(**36**) med samme substitusjonsmønster som CA-4⁵², og hydroksyphenstatin(**37**) er den tilsvarende analogen til CA-1.⁶⁹ *Isocombretastatinene*, for eksempel **38**, har også vist lik eller bedre effekt på tubulinhemming.^{46i, 52, 69-70}



Figur 21. Eksempler på strukturer med 1 atom i broen

Det finnes også mangfoldige rapporterte analoger med andre brotyper, blant annet metylen, eter, amin, amid og thioeter^{46b, 46i, 52, 53b, 66, 71}, men selv om flere av disse viste gode cytotoxiske egenskaper var det få som viste god aktivitet mot tubulindannelse.⁷¹

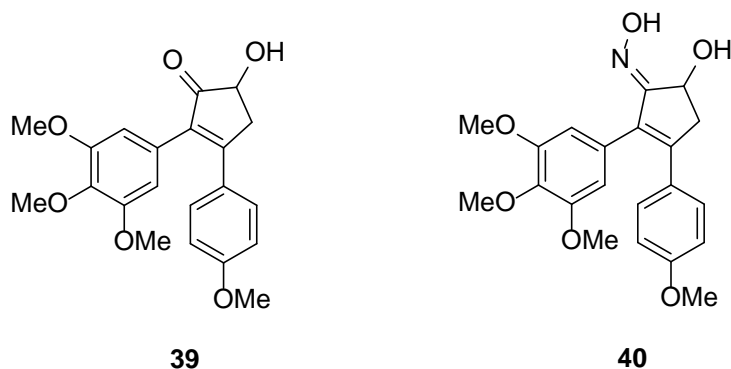
4.3.2 Analoger med 2 atomer i broen

Med hensyn til dobbeltbindingene, er avstanden mellom de to aromatiske ringene et viktig strukturelt trekk som er med på å avgjøre combretastatinenes evne til å binde seg til tubulin.^{51a} De fleste av de rapporterte SAR-studiene har blitt utført på stilbener, og det har også blitt evaluert en mengde med substituerte stilbener. Det er vist at *cis*-stilbener viser større cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet enn *trans*-stilbener.^{33b, 46b, 46f, 47, 50, 67}

Det har blitt introdusert estergrupper på broen, men disse endringene resulterte i tap av antitubulinaktivitet eller betydelig lavere cytotoxisk aktivitet. Introduksjon av en hydroksymetylgruppe resulterte i tap av tubulinhemmende aktivitet og 1/20 lavere cytotoxisk aktivitet sammenlignet med CA-4, mens introduksjon av en aminometylgruppe gav inaktivt produkt. Introduksjon av et aldehyd beholdt antimitotisk aktivitet, men reduserte cytotoxisitet.⁵⁸ Det er også i flere studier vist at introduksjon av forskjellige substituenten i enten α - eller β -posisjon på olefinet reduserer cytotoxisk og/eller inhibitorisk effekt på

tubulin.^{46b, 58, 68} Derivater med alkan- eller alkynbroer reduserte også cytotoxisk og antitubulin aktivitet.^{51a} Men introduksjon av et eller to fluoratomer på dobbeltbindingen, i motsetning til introduksjon av større grupper, har liten påvirkning på biologisk respons, og cytotoxiskitet og tubulinhemmende aktivitet er bevart.^{51a}

Ikke-heterosykliske analoger har også blitt evaluert som bro mellom ring A og B. Størrelsen på ringene har variert mellom tre og seks atomer, og blant de mer interessante analogene er noen 2,3-diarylsyklopentenonanaloger, blant annet **39**. De viser potent cytotoxiskitet, med $IC_{50} < 2.7 \text{ nM}$ i flere humane kreftcellerlinjer og utviser signifikant antitumoraktivitet *in vivo*. Karbonylgruppen viser seg å være viktig for aktivitet, da fjerning av denne fører til tap av aktivitet. Regioisomerer med karbonylgruppen vendende mot ring A viste seg å være den mest aktive. Karbonylgruppen har også blitt byttet ut med en oksim-gruppe og denne forbindelsen (**40**) hadde økt hemmende aktivitet på tubulin, sammenlignbar med CA-4.^{51b, 56b} Introduksjon av en syklopropylenhet har også vist moderat tubulinhemmende og cytotoxisk aktivitet, men dårligere sammenlignet med CA-4.⁷²

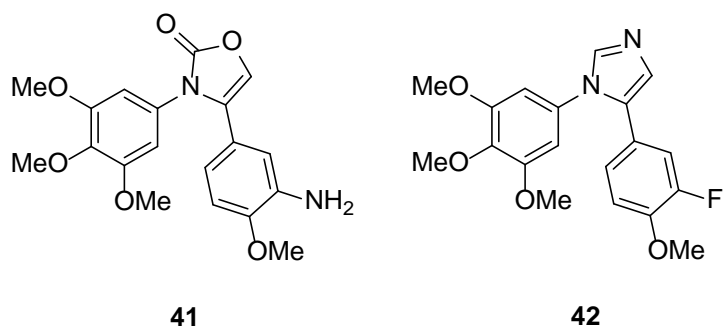


Figur 22. Eksempel på ikke-heterosykliske analoger

Det er også utprøvd mangfoldige heterosykler for å låse konfigurasjonen mellom ring A og B i et *cis*-forhold.^{33a, 34b, 46a, 46c, 56a-c, 68b, 73} Størrelsen på ringene varierer mellom tre til seks atomer, men det er rapportert flest analoger med fem atomer i ringen. Epoksider har blitt benyttet for å danne en treleddet ring og de viste moderat cytotoxisk aktivitet, men hadde ingen aktivitet på tubulin.^{68b} Flere *cis*- β -laktamanaloger er også vist å ha potent cytotoxisk aktivitet.^{73f}

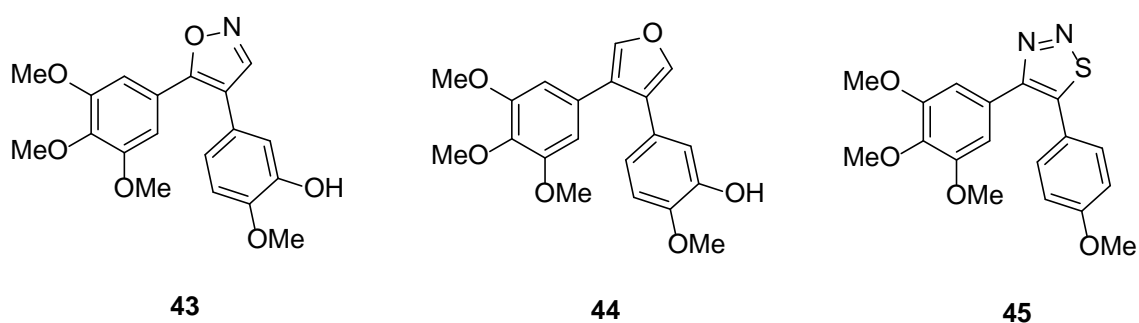
Mange av de femleddede heterosykliske analogene låst i *cis*-konfigurasjon har blitt evaluert for tubulinhemmende og veksthemmende aktivitet og har vist seg å være mindre aktive enn CA-4. Noen unntak er imidlertid noen diaryloxazoloner som har vist cytotoxisk aktivitet

sammenlignbar med CA-4. Blant disse har 3,4-diaryloxazonene vist bedre cytotoksisk aktivitet enn de 4,5-disubstituerte forbindelsene. Hydrokloridsaltet av 3,4-diaryloxazon(**41**) viste signifikant antitumoraktivitet *in vivo*.^{56a} Noen diarylimidazoler har også vist potent cytotoksisk aktivitet, og lignende tubulinhemmende aktivitet som CA-4. Analog **42**, en 1,5-diarylimidazolanalog, har vist bedre cytotoksisk aktivitet sammenlignet med CA-4.^{46c, 73i}



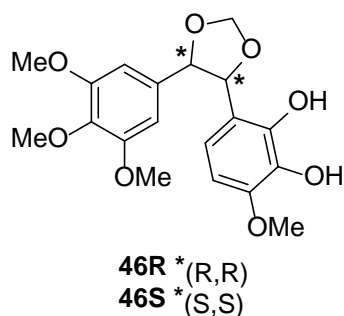
Figur 23. Strukturer av 3,4-diaryloxazonanalog **41** og 1,5-diarylimidazolanalog **42**

Flere 4,5-diaryloxazoler har vist lignende tubulinhemmende aktivitet sammenlignet med CA-4. Det er vist at 4,5-diarylisoaxozolanologen **43** gir bedre tubulinhemmende aktivitet, men lavere cytotoksisitet enn CA-4.^{46c, 73a} Combretafuran(**44**) har også vist cytotoksisk aktivitet sammenlignet med CA-4.^{73k} Det er også vist at introduksjon av en thiofenring ga moderat aktivitet,^{56e} mens noen C-2-substituerte thiazoler viste potent cytotoksisitet og inhibitorisk aktivitet på tubulin.⁷⁴ Noen 4,5-diaryl-1,2,3-thiadiazoler, som analog **45**, viser potent cytotoksisitet og tubulinhemmende aktivitet sammenlignbar med CA-4.^{56c}



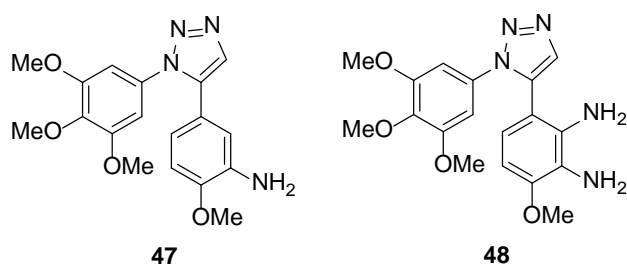
Figur 24. Strukturer av 4,5-diarylisoxazolanalog **43**, combretafuran **44** og 4,5-diaryl-1,2,3- thiadiazol **45**

Dioxolananologen dioxostatin(**46S**) viste potent hemming av mikrotubulidannelse, nesten dobbelt så potent som CA-1. Enantiomeren **46R** viste tubulinhemming ved konsentrasjoner ti ganger høyere enn CA-1.⁷⁵



Figur 25. Eksempel på en CA-1-analog med modifikasjon på broen

Det er også vist at triazoler kan gi gunstig aktivitet. En amino-substituert analog **47** viste potent cytotoxisk og moderat tubulinhemmende aktivitet, men viste også potent anivaskulær aktivitet med forlenget effekt sammenlignet med CA-4.^{33a, 76} Den tilsvarende analogen av CA-1, **48**, viste cytotoxisk effekt mot flere kreftcellelinjer i den «lave delen» av mikromolarområdet, i tillegg til tubulinhemmende aktivitet og effekt sammenlignbar med CA-1 og **47**.^{73q}

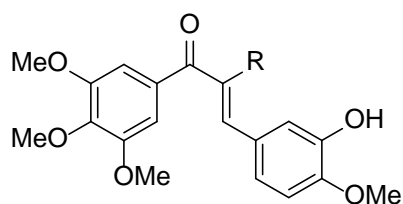


Figur 26. Strukturer av aminosubstituerte triazolanaloger

Ingen rapporterte heterosykler med seks atomer i ringen har vist biologisk aktivitet på linje med CA-4.^{73g, 73l}

4.3.3 Analoger med 3 atomer i broen

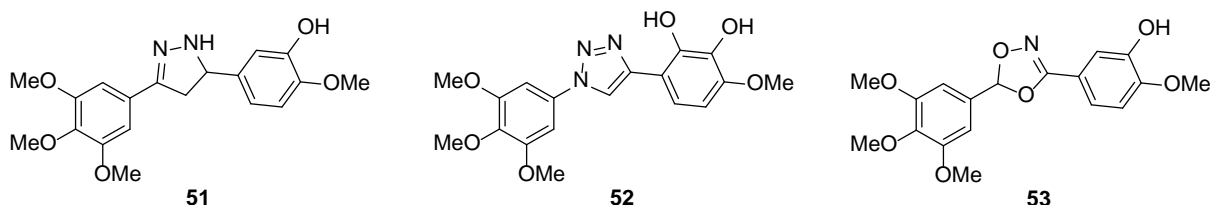
Det er rapportert flere analoger med tre atomer i broen mellom ring A og B. Alkaner⁶⁶, metylensulfonamider⁷⁷, chalkoner og forskjellige sykliske broer er eksempler på dette. Forskjellige chalkonanaloger har blitt fremstilt og testet for biologiske aktiviteter,⁷⁸ og chalkoner som vist i figur 27, har vist potent cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet tilsvarende CA-4. Det er også blitt laget chalkonlignende analoger, hvor olefinet er byttet ut med et epoksid, en pyrazolring^{78b} eller en større syklisk struktur, men sistnevnte gav liten eller ingen aktivitet på tubulinhemming.^{73l}



49: R=H
50: R=Me

Figur 27. Chalkoner med potent cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet

Pyrazoler, pyrazoliner, isoxazoler, isoxazoliner, dioxazoler, oxadiazoler og triazoler er eksempler på forskjellige heterosykliske enheter som har blitt brukt som bro hos potensielle CA-4-analoger.^{73a, 73g, 78b, 79} Studier viser at introduksjon av en 1,3-substituert heterosyklisk enhet som regel resulterer i forbindelser med nedsatt biologisk aktivitet, selv om cytotoxisiteten hos de mest aktive av disse analogene er i mikromolarområdet. En pyrazolinanalog(**51**) viste moderat tubulinhemmende aktivitet, mens en analog med triazol(**52**) ikke viste hemmende aktivitet på tubulin.⁷⁶ Denne viste derimot lignende eller bedre cytotoxisk aktivitet enn CA-1. Dioxazolen **53** viste moderat tubulinhemmende aktivitet, men ikke signifikant cytotoxisk aktivitet..

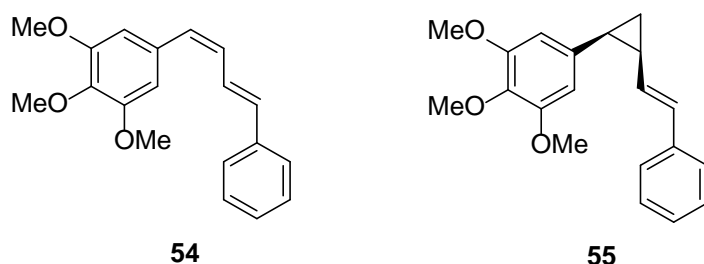


Figur 28. Struktur av pyrazolinanalog **51**, triazolanalog **52** og dioxazolanalog **53**

4.3.4 Analoger med fler enn tre atomer i broen

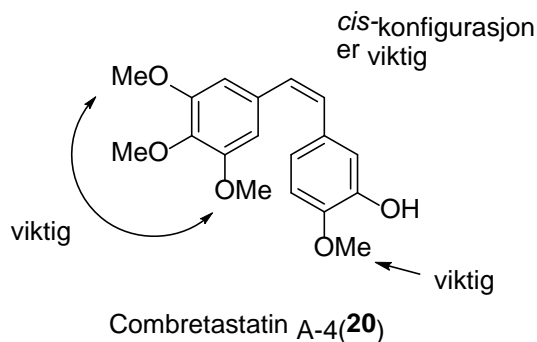
Det finnes ikke så veldig mange analoger med fire eller flere atomer i broen som har blitt testet for cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet. Men det har blitt vist at utskiftning av *cis*-dobbeltbindingen med en (E,Z)butadienenhet ga forbindelser som for eksempel **54**, med lik eller bedre depolymerisende aktivitet på mikrotubli enn CA-4. Den cytotoxiske aktiviteten derimot, var litt lavere enn hos CA-4. *cis*-dobbeltbindingen i **54** har også blitt skiftet ut med en *cis*-syklopropylenhet, analog **55**, og som ga lignende aktivitet, men

utskifting av hele broen med en syklopropylamidenhet førte til tap av antitubulinaktivitet, men ikke cytotoxisk aktivitet.^{51c, 80}



Figur 29. Strukturer av potente tubulinhemmende analoger med fire atomer i broen

4.4 Oppsummering av SAR

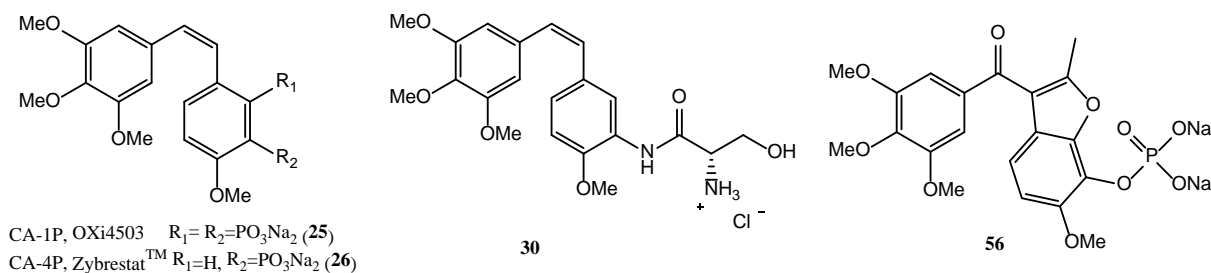


Figur 30. Viktige strukturelle elementer av CA-4(**20**)

Struktur-aktivitetsforholdene til CA-4 har blitt studert. Det er funnet at for å ha best aktivitet burde det være en 3,4,5-trimetoksyaryl-enhet og en metoksygruppe i 4'-posisjon. Endring av substituentene på A-ringene kan beholde inhibitorisk effekt på tubulin, men metoksygruppene er kan se ut til å være nødvendig for best cytotoxisk aktivitet. Innføring av en aminosubstituent i 2'-posisjon har derimot bevart cytotoxisk aktivitet. De to aromatiske ringene må være separert av en linker-enhet. Denne avstanden kan varieres, men som regel reduseres cytotoxisiteten ved økt brolengde ($2 > 3 > 4$). En *cis*-konfigurasjon på dobbeltbindingen er nødvendig for aktivitet og det er vist at å bytte ut olefinbroen med blant annet heterosykler som låser konfigurasjonen, som for eksempel thiadiazoler, thiofener eller triazoler, også kan gi gunstig aktivitet. Høy aktivitet vises også med en OH-gruppe i 3'-posisjon, men det er ikke nødvendig og denne gruppen er derfor et godt utgangspunkt for isosterisk modifisering. Substitusjon i 3'-posisjon ser også ut til å påvirke cytotoxisk aktivitet mer enn tubulinhemmende aktivitet..

4.5 Kliniske studier

På grunn av deres gode løselighet, sikkerhetsprofil og effekt er flere CA-4-analoger og en CA-1-analog for tiden i kliniske studier: CA-4P (Fosbretabulin), AVE-8062 (Ombrabulin), BNC105P og CA-1P-analogen Oxi4503.



Figur 31. Kjemisk struktur av CA1- og CA4-analoger i kliniske studier.

CA-4P(**25**) er for tiden i fase II/III –studier, blant annet i kombinasjon med paclitaxel og carboplatin, og har vist signifikant respons, spesielt ved tilbakevendende platinaresistent ovariekreft. Andre pågående studier undersøker effekten ved anaplastisk thyroidkreft og ved lungekreft.⁸¹

AVE-8062(**30**) har vært igjennom flere fase I-studier, blant annet i kombinasjon med docetaxel. I en fase II-studie ble det også testet ut effekt mot ovariekreft i kombinasjon med paclitaxel og carboplatin.^{57, 81} Utviklingen ble stanset i januar 2013 da en fase III studie ikke viste tilstrekkelig klinisk nytteverdi.⁸²

BNC105P(**56**) er et fosfatprodrug av CA-4-analogen BNC105(**31**). Kliniske studier i fase I viste signifikant nedgang i tumorperfusjon⁸³ og en ny fase II studie ble utført for å vise sikkerhet og effekt. Responsen var imidlertid ikke god nok til å berettigede videre forskning ved bruk alene.⁸⁴ BNC105P er for tiden i en fase I/II-studie i kombinasjon med Everolimus mot en type nyrekreft.⁵⁷

CA-1-derivatet Oxi4503(**26**) har fullført flere fase I-studier og en ny fase I-studie rekrutterer for tiden pasienter med tilbakevendende og refraktær akutt myeloisk leukemi (AML) og myelodysplastisk syndrom (MDS).^{57, 81} Studier har vist en doseavhengig lineær økning i maksimumskonsentrasjon i plasma, men dosene som har vist effekt kan bare bli tolerert når brukt sammen med forebyggende behandling mot hypertensjon.⁸¹

Fase I og II-studier med CA-1P og CA-4P har vist kardiovaskulær toksisitet med negative effekter som blant annet hypertensjon og arytmi. Disse bivirkningene var dosebegrensende i fase I –studier med VDA-monoterapi og som kombinasjonsterapi. Studier av VDAs har i tidlige faser vist en kardiovaskulær toksisitetsprofil lignende deres «motstykker», angiogeneseinhibitorene.⁸⁵

5 Konklusjon

Combretastatiner er utgangspunkt for mange struktur-aktivitetsstudier, og det er lagt mye arbeid i å forbedre kjemiske og biologiske egenskaper. CA-4 har spilt en ledende rolle i utviklingen av antivaskulære forbindelser. *In vitro* og *in vivo*-studier har vist lovende cytotoxisitet, tubulinhemmende og antivaskulær effekt. Flere av dets analoger blir i dag testet i kliniske studier og har vist interessante resultater, med lovende effekt ved behandling av tumorer, spesielt i kombinasjon med andre anticancerforbindelser. Det vil være viktig og i detalj bestemme den antivaskulære virkningsmekanismen for bedre å kunne forstå noen av bivirkningene og de toksiske effektene observert i pasientene. Det er også behov for videre SAR-studier av CA-4baserte analoger for eventuelt å kunne danne oralt biotilgjengelige forbindelser.

SAR- studier demonstrerer potensialet til CA-4 og CA-1 og deres derivater som en klasse antimitotiske kreftmidler. Ut i fra det store mangfoldet innen karakteristiske strukturelle elementer har en stor del av strukturaktivitetsforholdet blitt rapportert, noe som vil være til stor hjelp for videre utvikling av potente legemiddelkandidater. Dessuten antyder mangfoldet blant de effektive analogene fleksibilitet av kolkisinbindingssetet på tubulin og flere studier på interaksjon mellom disse analogene og kolkisinbindingssetet kan sørge for videre nyttig informasjon for design av en ny generasjon antimitotiske anticancerforbindelser.

Det er fortsatt stor interesse for naturprodukter som «lead compounds» i utviklingen og søket etter nye og effektive legemidler mot kreft. Det er sannsynlig at det også i fremtiden vil være naturprodukter som vil generere nye og interessante utgangsmolekyler for nye og nyttige anticancerlegemidler. Blant arsenalet av legemidler som bekjemper kreft kan tubulin-interaktive forbindelser fortsatt spille en viktig rolle.

Litteraturliste

1. Christoffersen, T.; Fluge, Ø.; Lehne, G.; Dahl, O., *Cytostatikaboken*, kapittel 1, Kreftceller og kjemoterapi. Farmakologisk institutt, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo: 2009. <http://cytostatikaboken.moses.no> (accessed 01.06.2013).
2. (a) Alberts, B., *Essential cell biology*. 2. ed.; Garland Science: New York, 2004, s.726-737; (b) Weinberg, R. A., *The biology of cancer*. Garland Science: New York, 2007, s.25-56.
3. Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T., Tubulin as a Target for Anticancer Drugs: Agents Which Interact with the Mitotic Spindle *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259-296.
4. (a) Kreftforeningen www.kreftforeningen.no/om-kreft/hva-er-kreft/ (accessed 01.06.13); (b) Globocan <http://globocan.iarc.fr> (accessed 01.06.13); (c) WHO http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html (accessed 01.06.13).
5. Kreftregisteret <http://www.kreftregisteret.no/no/Generelt/Fakta-om-kreft-test/> (accessed 01.05.13).
6. Dahl, O.; Kvaløy, S.; Lehne, G.; Baksaas, I.; Christoffersen, T., *Cytostatikaboken*, kapittel 2, Medikamentell kreftbehandling. Farmakologisk institutt, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo: 2009. <http://cytostatikaboken.moses.no> (accessed 01.12.13).
7. Weinberg, R. A., *The biology of cancer*. Garland Science: New York, 2007.
8. (a) Goodman, L. S.; Wintrobe, M. M.; Dameshek, W.; Goodman, M. J.; Gilman, A.; McLennan, M. T., Nitrogen mustard therapy: Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *JAMA* **1984**, *251* (17), 2255-2261; (b) Lehne, G.; Brydøy, M.; Thoresen, H.; Christoffersen, T., *Cytostatikaboken*, kapittel 11, Alkylerende midler. Farmakologisk institutt, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo: 2009. <http://cytostatikaboken.moses.no/> (accessed 01.05.13); (c) Brustugun, O. T.; Dajani, O.; Lehne, G.; Thoresen, G. H., *Norsk legemiddelhåndbok*, kapittel L2, Legemidler i behandlingen av kreftsykdommer. www.legemiddelhandboka.no (accessed 01.05.13).
9. Eikesdal, H. P.; Guren, T., *Cytostatikaboken*, kapittel 14, Tubulinhemmere. 2009. <http://cytostatikaboken.moses.no/> (accessed 01.05.13).
10. Thoresen, G. H.; Dajani, O., *Cytostatikaboken*, kapittel 16, Cytostatika med andre virkningsmekanismer. 2009. <http://cytostatikaboken.moses.no/> (accessed 01.05.13).
11. Hartmann, J. T.; Lipp, H. P., Camptothecin and podophyllotoxin derivatives. Inhibitors of topoisomerase I and II - Mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf* **2006**, *29*, 209-230.
12. Altmann, K.-H.; Wartmann, M.; O'Reilly, T., Epothilones and related structures – a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2000**, *1470* (3), M79-M91.
13. (a) Kaiser, S.; Muller, J. J.; Froehlich, P. E., From Bacteria to Antineoplastic: Epothilones A Successful History. *Anticancer Agents Med Chem* **2013**, *13* (7), 1057-1068; (b) Egerton, N., Ixabepilone (Ixempra), a Therapeutic Option for Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer. *P&T* **2008**, *33* (9), 523-531.
14. Tveteraas, I. H.; Lundgren, S.; Bruserud, Ø.; Slørdal, L., *Cytostatikaboken*, kapittel 15, Antibiotika med cytostatisk effekt. 2009. <http://cytostatikaboken.moses.no/> (accessed 01.05.13).
15. Dahl, O.; Lehne, G.; Baksaas, I.; Kvaløy, S.; Christoffersen, T., *Cytostatikaboken*, Del II, Medikamentene. 2009. <http://cytostatikaboken.moses.no/> (accessed 01.05.13).

16. Gensidene www.gensidene.uib.no (accessed 01.05.13).
17. Sherr, C. J., Cancer Cell Cycles. *Science* **1996**, 274 (5293), 1672-1677.
18. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4. ed.; Garland Science: New York, 2002, s 983-990.
19. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4. ed.; Garland Science: New York, 2002, s.580.
20. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4. ed.; Garland Science: New York, 2002, s. 1028-1036.
21. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4. ed.; Garland Science: New York, 2002, s.908-920.
22. Alberts, B., *Essential cell biology*. 2. ed.; Garland Science: New York, 2004, s. 580.
23. Graham, J. G.; Quinn, M. L.; Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R., Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, 73, 347-377.
24. Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J., Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (3012-3043).
25. Hamel, E., *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*. Humana Press: Totowa, 2008, s 1-19.
26. Pinney, K. G.; Pettit, G. R.; Trawick, M. L.; Jelinek, C.; Chaplin, D. J., *Anticancer Agents from Natural Products*. CRC Press: 2011, s 23-46.
27. Brun, J. G., *Norsk legemiddelhåndbok*, kapittel L17, Legemidler ved muskel- og skjelettsykdommer. <http://legemiddelhandboka.no> (accessed 01.05.13).
28. Ducray, P.; Lebeau, L.; Mioskowski, C., Synthesis of lipid derivatives of colchicine. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79 (8), 2346-2352.
29. Jordan, M. A.; Wilson, L., *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*. Humana Press: Totowa, 2008, s 47-81.
30. (a) Young, S. L.; Chaplin, D. J., Combretastatin A4 phosphate: background and current clinical status. *Expert Opin. Inv. Drugs* **2004**, 13, 1171-1182; (b) Cirila, A.; Mann, J., Combretastatins: from natural products to drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 558-564.
31. Chaplin, D.; Hill, S. A., *Vascular-targeted therapies in oncology*. Siemann, D. W., Ed. John Wiley & Sons, Ltd: 2006, s 63-80.
32. (a) Oxigene www.oxigene.com (accessed 01.05.13); (b) Tanpure, R. P.; Ngyen, B. L.; Strecker, T. E.; Aguirre, S.; Sharma, S.; Chaplin, D. J.; Siim, B. G.; Hamel, E.; Lippert, J. W.; Pettit, G. R.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G., Regioselective Synthesis of Water-Soluble Monophosphate Derivatives of Combretastatin A-1. *J. Nat. Prod* **2011**, 74, 1568-1574.
33. (a) Odlo, K.; Fournier-Dit-Chabert, J.; Ducki, S.; Gani, O. A. B. S. M.; Sylte, I.; Hansen, T. V., 1,2,3-Triazole analogs of combretastatin A-4 as potential microtubule-binding agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18 (18), 6874-6885; (b) Lin, C. M.; Singh, S. B.; Chu, P. S.; Dempcy, R. O.; Schmidt, J. M.; Pettit, G. R.; Hamel, E., Interactions of Tubulin with Potent Natural and Synthetic Analogs of the Antimitotic Agent Combretastatin: a Structure-Activity Study. *Mol. Pharmacol.* **1988**, 34, 200-208.
34. (a) Islam, M. N.; Iskander, M. N., Microtubulin Binding Sites as Target for Developing Anticancer Agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, 4, 1077-1104; (b) Odlo, K.; Hentzen, J.; dit Chabert, J. F.; Ducki, S.; Gani, O. A. B. S. M.; Sylte, I.; Skrede, M.; Flørenes, V. A.; Hansen, T. V., 1,5-Disubstituted 1,2,3-triazoles as cis-restricted analogues of combretastatin A-4: Synthesis, molecular modeling and evaluation as cytotoxic agents and inhibitors of tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16 (9), 4829-4838.
35. Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Herald, D. L.; Schmidt, J. M.; Lohavanijaya, P., Isolation and structure of combretastatin. *Can. J. Chem.* **1982**, 60 (11), 1374-1376.

36. (a) Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D., Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia* **1989**, *45* (2), 209-211; (b) Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Niven, M. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M., Isolation, Structure, and Synthesis of Combretastatins A-1 and B-1, Potent New Inhibitors of Microtubule Assembly, Derived from *Combretum caffrum*. *J. Nat. Prod* **1987**, *50* (1), 119-131.
37. (a) Rustin, G. J. S.; Galbraith, S. M.; Anderson, H.; Stratford, M.; Folkes, L. K.; Sena, L., Phase I Clinical Trial of Weekly Combretastatin A4 Phosphate: Clinical and Pharmacokinetic Results. *J. Clin. Oncol* **2003**, *21*, 2815-2822; (b) Kirwan, I. G.; Loadman, P. M.; Swaine, D. J.; Anthoney, D. A.; Pettit, G. R.; Lippert, J. W.; Shnyder, S. D.; Cooper, P. A.; Bibby, M. C., Comparative Preclinical Pharmacokinetic and Metabolic Studies of the Combretastatin Prodrugs Combretastatin A4 Phosphate and A1 Phosphate. *Clinical Cancer Research* **2004**, *10* (4), 1446-1453.
38. (a) Woods, J. A.; Hadfield, J. A.; Pettit, G. R.; Fox, B. W.; McGown, A. T., The interaction with tubulin of a series of stilbenes based on combretastatin A-4. *Br J Cancer* **1995**, *71* (4), 705-711; (b) Suggitt, M.; Swaine, D. J.; Pettit, G. R.; Bibby, M. C., Characterization of the Hollow Fiber Assay for the Determination of Microtubule Disruption In vivo. *Clinical Cancer Research* **2004**, *10* (19), 6677-6685.
39. McGown, A.; Fox, B., Differential cytotoxicity of Combretastatins A1 and A4 in two daunorubicin-resistant P388 cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1990**, *26* (1), 79-81.
40. (a) Chaplin, D. J.; Dougherty, G. J.; Siemann, D. W., *Antiangiogenic Cancer Therapy*. Davis, D. W.; Herbst, R. S.; Abbruzzese, J. L., Eds. CRC Press: Boca Raton, 2008, s.329-364; (b) Giavazzi, R.; Bonezzi, K.; Taraboletti, G., *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*. Fojo, T., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2008, s.519-530.
41. Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J., Combretastatin A-4, an Agent That Displays Potent and Selective Toxicity toward Tumor Vasculature. *Cancer Research* **1997**, *57* (10), 1829-1834.
42. Dowlati, A.; Robertson, K.; Cooney, M.; Petros, W. P.; Stratford, M.; Jesberger, J.; Rafie, N.; Overmoyer, B.; Makkar, V.; Stambler, B.; Taylor, A.; Waas, J.; Lewin, J. S.; McCrae, K. R.; Remick, S. C., A Phase I Pharmacokinetic and Translational Study of the Novel Vascular Targeting Agent Combretastatin A-4 Phosphate on a Single-Dose Intravenous Schedule in Patients with Advanced Cancer. *Cancer Res.* **2002**, *62* (12), 3408-3416.
43. Salmon, H. W.; Siemann, D. W., Effect of the Second-Generation Vascular Disrupting Agent OXi4503 on Tumor Vascularity. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12* (13), 4090-4094.
44. Kanthou, C.; Tozer, G. M., Tumour targeting by microtubule-depolymerising vascular disrupting agents. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11* (11), 1443-1457.
45. (a) Singh, R.; Kaur, H., Advances in Synthetic Approaches for the Preparation of Combretastatin-Based Anti-Cancer Agents. *Synthesis* **2009**, 2009 (EFirst), 2471-2491; (b) Srivastava, V.; Negi, A. S.; Kumar, J. K.; Gupta, M. M.; Khanuja, S. P. S., Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13* (21), 5892-5908; (c) Tron, G. C.; Piralì, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A., Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (11), 3033-3044.
46. (a) Tron, G. C.; Pagliai, F.; Del Grosso, E.; Genazzani, A. A.; Sorba, G., Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Combretastatins. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48* (9), 3260-3268; (b) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; He, H. M.; Lin, C. M.; Hamel, E., Synthesis and evaluation of analogs of (Z)-1-(4-methoxyphenyl)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethene as potential cytotoxic and antimitotic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, *35* (12), 2293-2306; (c) Wang, L.; Woods, K. W.; Li, Q.; Barr, K. J.;

McCroskey, R. W.; Hannick, S. M.; Gherke, L.; Credo, R. B.; Hui, Y.-H.; Marsh, K.; Warner, R.; Lee, J. Y.; Zielinski-Mozng, N.; Frost, D.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L., Potent, Orally Active Heterocycle-Based Combretastatin A-4 Analogues: Synthesis, Structure–Activity Relationship, Pharmacokinetics, and In Vivo Antitumor Activity Evaluation. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (8), 1697-1711; (d) Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan, S.; McGown, A. T., Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (17), 3033-3037; (e) Maya, A. B. S.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M., Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (2), 556-568; (f) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A. K.; Lin, C. M.; Hamel, E., Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (8), 2579-2588; (g) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Pavani, M. G.; Tabrizi, M. A.; Preti, D.; Fruttarolo, F.; Piccagli, L.; Jung, M. K.; Hamel, E.; Borgatti, M.; Gambari, R., Synthesis and Biological Evaluation of 2-Amino-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-5-aryl Thiophenes as a New Class of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (13), 3906-3915; (h) Alvarez, C.; Alvarez, R.; Corchete, P.; Perez-Melero, C.; Pelaez, R.; Medarde, M., Synthesis and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: Naphthylphenstatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3417-3420; (i) Alvarez, R.; Alvarez, C.; Mollinedo, F.; Sierra, B. G.; Medarde, M.; Pelaez, R., Isocombretastatins A: 1,1-Diarylethenes as potent inhibitors of tubulin polymerization and cytotoxic compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6422-6431.

47. Pettit, G. R.; Minardi, M. D.; Rosenberg, H. J.; Hamel, E.; Bibby, M. C.; Martin, S. W.; Jung, M. K.; Pettit, R. K.; Cuthbertson, T. J.; Chapuis, J.-C., Antineoplastic Agents. 509. Synthesis of Fluorcombstatin Phosphate and Related 3-Halostilbenes. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68* (10), 1450-1458.

48. Chang, J.-Y.; Yang, M.-F.; Chang, C.-Y.; Chen, C.-M.; Kuo, C.-C.; Liou, J.-P., 2-Amino and 2'-Aminocombretastatin Derivatives as Potent Antimitotic Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6412-6415.

49. (a) Medarde, M.; Ramos, A.; Caballero, E.; Clairac, R. P.-L. d.; López, J. L.; Grávalos, D. G.; Feliciano, A. S., Synthesis and antineoplastic activity of combretastatin analogues: Heterocombretastatins. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33* (1), 71-77; (b) Kumar, S.; Mehndiratta, S.; Nepali, K.; Gupta, M. K.; Koul, S.; Sharma, P. R.; Saxena, A. K.; Dhar, K. L., Novel indole-bearing combretastatin analogue as tubulin polymerization inhibitors. *Org. Med. Chem. Lett.* **2013**, *3*, 1-13.

50. Maya, A. B. S.; Rey, B. d.; Pelaez Lamamie de Clairac, R.; Caballero, E.; Barasoain, I.; Andreu, J. M.; Medarde, M., Design, synthesis and cytotoxic activities of naphthyl analogues of combretastatin A-4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (22), 2549-2551.

51. (a) Alloatti, D.; Giannini, G.; Cabri, W.; Lustrati, I.; Marzi, M.; Ciacci, A.; Gallo, G.; Tinti, M. O.; Marcellini, M.; Riccioni, T.; Guglielmi, M. B.; Carminati, P.; Pisano, C., Synthesis and Biological Activity of Fluorinated Combretastatin Analogues. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2708-2721; (b) Gurjar, M. K.; Wakharkar, R. D.; Singh, A. T.; Jaggi, M.; Borate, H. B.; Shinde, P. D.; Verma, R.; Rajendran, P.; Dutt, S.; Singh, G.; Sanna, V. K.; Singh, M. K.; Srivastava, S. K.; Mahajan, V. A.; Jadhav, V. H.; Dutta, K.; Krishnan, K.; Chaudhary, A.; Agarwal, S. K.; Mukherjee, R.; Burman, A. C., Synthesis and Evaluation of 4/5-Hydroxy-2,3-diaryl(substituted)-cyclopent-2-en-1-ones as cis-Restricted Analogues of Combretastatin A-4 as Novel Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (8), 1744-1753; (c) Liou, J.-P.; Chang, J.-Y.; Chang, C.-W.; Chang, C.-Y.; Mahindroo, N.; Kuo, F.-M.; Hsieh, H.-P., Synthesis and Structure–Activity Relationships of 3-Aminobenzophenones as Antimitotic Agents. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (11), 2897-2905.

52. Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K., Antineoplastic Agents. 379. Synthesis of Phenstatin Phosphate. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (10), 1688-1695.
53. (a) Blanch, N. M.; Chabot, G. G.; Quentin, L.; Scherman, D.; Bourg, S.; Dauzonne, D., In vitro and in vivo biological evaluation of new 4,5-disubstituted 1,2,3-triazoles as cis-constrained analogs of combretastatin A4. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 22-32; (b) Lawrence, N. J.; Rennison, D.; Woo, M.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A., Antimitotic and cell growth inhibitory properties of combretastatin A-4-like ethers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (1), 51-54; (c) Bailly, C.; Bal, C.; Barbier, P.; Combes, S.; Finet, J.-P.; Hildebrand, M.-P.; Peyrot, V.; Wattez, N., Synthesis and Biological Evaluation of 4-Arylcoumarin Analogues of Combretastatins. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (25), 5437-5444; (d) Sun, C.-M.; Lin, L.-G.; Yu, H.-J.; Cheng, C.-Y.; Tsai, Y.-C.; Chu, C.-W.; Din, Y.-H.; Chau, Y.-P.; Don, M.-J., Synthesis and cytotoxic activities of 4,5-diarylisoaxazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (4), 1078-1081.
54. Torijano-Gutiérrez, S.; Díaz-Oltra, S.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A., Synthesis of combretastatin A-4 O-alkyl derivatives and evaluation of their cytotoxic, antiangiogenic and antitelomerase activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (23), 7267-7274.
55. Pinney, K. G.; Mejia, M. P.; Villalobos, V. M.; Rosenquist, B. E.; Pettit, G. R.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E., Synthesis and biological evaluation of aryl azide derivatives of combretastatin a-4 as molecular probes for tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (10), 2417-2425.
56. (a) Nam, N.-H.; Kim, Y.; You, Y.-J.; Hong, D.-H.; Kim, H.-M.; Ahn, B.-Z., Combretoxazolones: synthesis, cytotoxicity and antitumor activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (23), 3073-3076; (b) Nam, N.-H.; Kim, Y.; You, Y.-J.; Hong, D.-H.; Kim, H.-M.; Ahn, B.-Z., Synthesis and anti-tumor activity of novel combretastatins: combretocyclopentenones and related analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (15), 1955-1958; (c) Wu, M.; Sun, Q.; Yang, C.; Chen, D.; Ding, J.; Chen, Y.; Lin, L.; Xie, Y., Synthesis and activity of Combretastatin A-4 analogues: 1,2,3-thiadiazoles as potent antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (4), 869-873; (d) Pettit, G. R.; Anderson, C. R.; Herald, D. L.; Jung, M. K.; Lee, D. J.; Hamel, E.; Pettit, R. K., Antineoplastic Agents. 487. Synthesis and Biological Evaluation of the Antineoplastic Agent 3,4-Methylenedioxy-5,4'-dimethoxy-3'-amino-Z-stilbene and Derived Amino Acid Amides. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (4), 525-531; (e) Qiao, F.; Zuo, D.; Shen, X.; Qi, H.; Wang, H.; Zhang, W.; Wu, Y., DAT-230, a novel microtubule inhibitor, exhibits potent anti-tumor activity by inducing G2/M phase arrest, apoptosis in vitro and perfusion decrease in vivo to HT-1080. *Cancer Chemother Pharmacol* **2012**, *70*, 259-270; (f) Hori, K.; Saito, S.; Kubota, K., A novel combretastatin A-4 derivative, AC7700, strongly stanches tumour blood flow and inhibits growth of tumours developing in various tissues and organs. *Br J Cancer* **2002**, *86* (10), 1604-1614.
57. NIH, U. <http://clinicaltrials.gov/> (accessed 11.12.13).
58. Ohsumi, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Hatanaka, T.; Morinaga, Y.; Nihei, Y.; Ohishi, K.; Suga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T., Novel Combretastatin Analogues Effective against Murine Solid Tumors: Design and Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (16), 3022-3032.
59. (a) Lawrence, N. J.; Hepworth, L. A.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A., Synthesis and anticancer activity of fluorinated analogues of combretastatin A-4. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *123* (1), 101-108; (b) Malysheva, Y. B.; Combes, S.; Fedorov, A. Y.; Knochel, P.; Gavryushin, A. E., New Method of Synthesis and Biological Evaluation of Some Combretastatin A-4 Analogues. *Synlett* **2012**, *23*, 1205-1208.

60. Kong, Y.; Grembecka, J.; Edler, M. C.; Hamel, E.; Mooberry, S. L.; Sabat, M.; Rieger, J.; Brown, M. L., Structure-Based Discovery of a Boronic Acid Bioisostere of Combretastatin A-4. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (9), 1007-1014.
61. Nguyen, T. T. B.; Lomberget, T.; Tran, N. C.; Colomb, E.; Nachtergaele, L.; Thoret, S.; Dubois, J.; Guillaume, J.; Abdayem, R.; Haftek, M.; Barret, R., Synthesis and biological evaluation of novel heterocyclic derivatives of combretastatin A-4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (23), 7227-7231.
62. Flynn, B. L.; Gill, G. S.; Grobelny, D. W.; Chaplin, J. H.; Paul, D.; Leske, A. F.; Lavranos, T. C.; Chalmers, D. K.; Charman, S. A.; Kostewicz, E.; Shackelford, D. M.; Morizzi, J.; Hamel, E.; Jung, M. K.; Kremmidiotis, G., Discovery of 7-Hydroxy-6-methoxy-2-methyl-3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)benzo[b]furan (BNC105), a Tubulin Polymerization Inhibitor with Potent Antiproliferative and Tumor Vascular Disrupting Properties. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (17), 6014-6027.
63. Parihar, S.; Kumar, A.; Chaturvedi, A. K.; Sachan, N. K.; Luqman, S.; Changkija, B.; Manohar, M.; Prakash, O.; Chanda, D.; Khan, F.; Chanotiya, C. S.; Shanker, K.; Dwivedi, A.; Konwar, R.; Negi, A. S., Synthesis of combretastatin A4 analogues on steroidal framework and their anti-breast cancer activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2013**, *137* (0), 332-344.
64. Monk, K. A.; Siles, R.; Hadimani, M. B.; Mugabe, B. E.; Ackley, J. F.; Studerus, S. W.; Edvardsen, K.; Trawick, M. L.; Garner, C. M.; Rhodes, M. R.; Pettit, G. R.; Pinney, K. G., Design, synthesis, and biological evaluation of combretastatin nitrogen-containing derivatives as inhibitors of tubulin assembly and vascular disrupting agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (9), 3231-3244.
65. Siles, R.; Ackley, J. F.; Hadimani, M. B.; Hall, J. J.; Mugabe, B. E.; Guddneppanavar, R.; Monk, K. A.; Chapuis, J.-C.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J.; Edvardsen, K.; Trawick, M. L.; Garner, C. M.; Pinney, K. G., Combretastatin Dinitrogen-Substituted Stilbene Analogues as Tubulin-Binding and Vascular-Disrupting Agents. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (3), 313-320.
66. Getahun, Z.; Jurd, L.; Chu, P. S.; Lin, C. M.; Hamel, E., Synthesis of alkoxy-substituted diaryl compounds and correlation of ring separation with inhibition of tubulin polymerization: differential enhancement of inhibitory effects under suboptimal polymerization reaction conditions. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (6), 1058-1067.
67. Simoni, D.; Romagnoli, R.; Baruchello, R.; Rondanin, R.; Grisolia, G.; Eleopra, M.; Rizzi, M.; Tolomeo, M.; Giannini, G.; Alloatti, D.; Castorina, M.; Marcellini, M.; Pisano, C., Novel A-Ring and B-Ring Modified Combretastatin A-4 (CA-4) Analogues Endowed with Interesting Cytotoxic Activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (19), 6211-6215.
68. (a) Borrel, C.; Thoret, S.; Cachet, X.; Guénard, D.; Tillequin, F.; Koch, M.; Michel, S., New antitubulin derivatives in the combretastatin A4 series: synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (11), 3853-3864; (b) Hadfield, J. A.; Gaukroger, K.; Hirst, N.; Weston, A. P.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T., Synthesis and evaluation of double bond substituted combretastatins. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40* (6), 529-541; (c) Tanpure, R. P.; Harkrider, A. R.; Strecker, T. E.; Hamel, E.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G., Application of the McMurry coupling reaction in the synthesis of tri- and tetra-arylethylene analogues as potential cancer chemotherapeutic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (19), 6993-7001.
69. Pettit, G. R.; Grealish, M. P.; Herald, D. L.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K., Antineoplastic Agents. 443. Synthesis of the Cancer Cell Growth Inhibitor Hydroxyphenstatin and Its Sodium Diphosphate Prodrug. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (14), 2731-2737.
70. Messaoudi, S.; Tréguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J.-F. o.; De Losada, J. R.; Liu, J.-M.; Bignon, J. r. m.; Wdziejczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J. l.; Brion, J.-D.; Alami, M. d., Isocombretastatins A versus Combretastatins A: The Forgotten isoCA-4 Isomer

as a Highly Promising Cytotoxic and Antitubulin Agent. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (14), 4538-4542.

71. Aleksandrzak, K.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A., Antimitotic activity of diaryl compounds with structural features resembling combretastatin A-4. *Anti-Cancer Drugs* **1998**, 9, 545-550.

72. Ty, N.; Pontikis, R.; Chabot, G. G.; Devillers, E.; Quentin, L.; Bourg, S.; Florent, J.-C., Synthesis and biological evaluation of enantiomerically pure cyclopropyl analogues of combretastatin A4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21 (5), 1357-1366.

73. (a) Kaffy, J.; Pontikis, R.; Carrez, D.; Croisy, A.; Monneret, C.; Florent, J.-C., Isoxazole-type derivatives related to combretastatin A-4, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14 (12), 4067-4077; (b) Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Fujita, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T., Syntheses and antitumor activity of cis-restricted combretastatins: 5-Membered heterocyclic analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8 (22), 3153-3158; (c) Shirai, R.; Takayama, H.; Nishikawa, A.; Koiso, Y.; Hashimoto, Y., Asymmetric synthesis of antimitotic combretadioxolane with potent antitumor activity against multi-drug resistant cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8 (15), 1997-2000; (d) Banwell, M. G.; Flynn, B. L.; Hamel, E.; Willis, A. C., Synthesis, X-Ray Crystal Structure and Tubulin- Binding Properties of a Benzofuran Analogue of the Potent Cytotoxic Agent Combretastatin A4. *Aust. J. Chem.* **1999**, 52 (8), 767-774; (e) Medarde, M.; Ramos, A. C.; Caballero, E.; Clairac, R. P.-L.; López, J. L.; Grávalos, D. G.; Feliciano, A. S., Synthesis and pharmacological activity of diarylindole derivatives. Cytotoxic agents based on combretastatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9 (16), 2303-2308; (f) Sun, L.; Vasilevich, N. I.; Fuselier, J. A.; Hocart, S. J.; Coy, D. H., Examination of the 1,4-disubstituted azetidinone ring system as a template for combretastatin A-4 conformationally restricted analogue design. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14 (9), 2041-2046; (g) Simoni, D.; Grisolia, G.; Giannini, G.; Roberti, M.; Rondanin, R.; Piccagli, L.; Baruchello, R.; Rossi, M.; Romagnoli, R.; Invidiata, F. P.; Grimaudo, S.; Jung, M. K.; Hamel, E.; Gebbia, N.; Crosta, L.; Abbadessa, V.; Di Cristina, A.; Dusonchet, L.; Meli, M.; Tolomeo, M., Heterocyclic and Phenyl Double-Bond-Locked Combretastatin Analogues Possessing Potent Apoptosis-Inducing Activity in HL60 and in MDR Cell Lines. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (3), 723-736; (h) Banwell, M. G.; Hamel, E.; Hockless, D. C. R.; Verdier-Pinard, P.; Willis, A. C.; Wong, D. J., 4,5-Diaryl-1H-pyrrole-2-carboxylates as combretastatin A-4/lamellarin T hybrids: Synthesis and evaluation as anti-mitotic and cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14 (13), 4627-4638; (i) Bellina, F.; Cauteruccio, S.; Monti, S.; Rossi, R., Novel imidazole-based combretastatin A-4 analogues: Evaluation of their in vitro antitumor activity and molecular modeling study of their binding to the colchicine site of tubulin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (22), 5757-5762; (j) Peifer, C.; Stoiber, T.; Unger, E.; Totzke, F.; Schächtele, C.; Marmé, D.; Brenk, R.; Klebe, G.; Schollmeyer, D.; Dannhardt, G., Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 3,4-Diarylmaleimides as Angiogenesis Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (4), 1271-1281; (k) Pirali, T.; Busacca, S.; Beltrami, L.; Imovilli, D.; Pagliai, F.; Miglio, G.; Massarotti, A.; Verotta, L.; Tron, G. C.; Sorba, G.; Genazzani, A. A., Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Combretafurans, Potential Scaffolds for Dual-Action Antitumoral Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (17), 5372-5376; (l) Quintin, J.; Roullier, C.; Thoret, S.; Lewin, G., Synthesis and anti-tubulin evaluation of chromone-based analogues of combretastatins. *Tetrahedron* **2006**, 62 (17), 4038-4051; (m) Zhang, Q.; Peng, Y.; Wang, X. I.; Keenan, S. M.; Arora, S.; Welsh, W. J., Highly Potent Triazole-Based Tubulin Polymerization Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (4), 749-754; (n) Cafici, L.; Pirali, T.; Condorelli, F.; Del Grosso, E.; Massarotti, A.; Sorba, G.; Canonico, P. L.; Tron, G. C.; Genazzani, A. A., Solution-Phase Parallel Synthesis and Biological Evaluation of Combretatriazoles. *J. Comb. Chem.* **2008**, 10 (5), 732-740; (o) Xue, N.; Yang, X.; Wu, R.;

- Chen, J.; He, Q.; Yang, B.; Lu, X.; Hu, Y., Synthesis and biological evaluation of imidazol-2-one derivatives as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (5), 2550-2557;
- (p) Wu, R.; Ding, W.; Liu, T.; Zhu, H.; Hu, Y.; Yang, B.; He, Q., XN05, a novel synthesized microtubule inhibitor, exhibits potent activity against human carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett.* **2009**, *285* (1), 13-22; (q) Akselsen, Ø. W.; Odlo, K.; Cheng, J.-J.; Maccari, G.; Botta, M.; Hansen, T. V., Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of 1,2,3-triazole analogs of combretastatin A-1. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (1), 234-242.
74. (a) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Brancale, A.; Ricci, A.; Hamel, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G., Convergent Synthesis and Biological Evaluation of 2-Amino-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-aryl Thiazoles as Microtubule Targeting Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (14), 5144-5153; (b) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Salvador, M. K.; Camacho, M. E.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Bassetto, M.; Brancale, A.; Hamel, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G., Synthesis and biological evaluation of 2-substituted-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-aryl thiazoles as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (24), 7083-7094.
75. Pettit, G. R.; Lippert, J. W.; Boyd, M. R.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E., Antineoplastic agents 442. Synthesis and biological activities of dioxostatin. *Anti-cancer Drug Des.* **2000**, *15*, 361-371.
76. Odlo, K. Synthesis and Biological Evaluation of 1,2,3-Triazole Analogues of Combretastatins A-4 and A-1. University of Oslo, Oslo, 2010.
77. Hu, L.; Li, Z.-r.; Li, Y.; Qu, J.; Ling, Y.-H.; Jiang, J.-d.; Boykin, D. W., Synthesis and Structure–Activity Relationships of Carbazole Sulfonamides as a Novel Class of Antimitotic Agents Against Solid Tumors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6273-6282.
78. (a) Lawrence, N. J.; McGown, A. T., The Chemistry and Biology of Antimitotic Chalcones and Related Enone Systems. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 1679-1693; (b) LeBlanc, R.; Dickson, J.; Brown, T.; Stewart, M.; Pati, H. N.; VanDerveer, D.; Arman, H.; Harris, J.; Pennington, W.; Holt Jr, H. L.; Lee, M., Synthesis and cytotoxicity of epoxide and pyrazole analogs of the combretastatins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13* (21), 6025-6034; (c) Kerr, D. J.; Hamel, E.; Jung, M. K.; Flynn, B. L., The concise synthesis of chalcone, indanone and indenone analogues of combretastatin A4. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (9), 3290-3298; (d) Ducki, S.; Mackenzie, G.; Greedy, B.; Armitage, S.; Chabert, J. F. D.; Bennett, E.; Nettles, J.; Snyder, J. P.; Lawrence, N. J., Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerisation. Part 2: Structure-based discovery of alpha-aryl chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (22), 7711-7722; (e) Ducki, S.; Rennison, D.; Woo, M.; Kendall, A.; Chabert, J. F. D.; McGown, A. T.; Lawrence, N. J., Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: Synthesis and biological evaluation of antivasular activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (22), 7698-7710.
79. (a) Pagliai, F.; Pirali, T.; Del Grosso, E.; Di Brisco, R.; Tron, G. C.; Sorba, G.; Genazzani, A. A., Rapid Synthesis of Triazole-Modified Resveratrol Analogues via Click Chemistry. *J. Med. Chem.* **2005**, *49* (2), 467-470; (b) Johnson, M.; Younglove, B.; Lee, L.; LeBlanc, R.; Holt Jr, H.; Hills, P.; Mackay, H.; Brown, T.; Mooberry, S. L.; Lee, M., Design, synthesis, and biological testing of pyrazoline derivatives of combretastatin-A4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (21), 5897-5901.
80. (a) Kaffy, J.; Pontikis, R.; Florent, J.-C.; Monneret, C., Synthesis and biological evaluation of vinylogous combretastatin A-4 derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (14), 2657-2660; (b) Chen, H.; Li, Y.; Sheng, C.; Lv, Z.; Dong, G.; Wang, T.; Liu, J.; Zhang, M.; Li, L.; Zhang, T.; Geng, D.; Niu, C.; Li, K., Design and Synthesis of Cyclopropylamide Analogues of Combretastatin-A4 as Novel Microtubule-Stabilizing Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56* (3), 685-699.

81. Arora, S.; Gonzalez, A. F.; Solanki, K., Combretastatin A-4 and its Analogs in Cancer Therapy. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2013**, 22 (2), 168-174.
82. UKMi
http://www.ukmi.nhs.uk/applications/ndo/record_view_open.asp?newDrugID=4775
(accessed 01.12.13).
83. Rischin, D.; Bibby, D. C.; Chong, G. K., G.; Leske, A.; Matthews, A.; Wong, S.; Rosen, M.; Desai, J., Clinical, Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Evaluation of BNC105P: a Phase I Trial of a Novel Vascular Disrupting Agent and Inhibitor of Cancer Cell Proliferation. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17 (15), 5152-5160.
84. Nowak, A. K.; Brown, C.; Millward, M. J.; Creaney, J.; Byrne, M. J.; Hughes, B.; Kremmidiotis, G.; Bibby, D. C.; Leske, A. F.; Mitchell, P. L.; Pavlakis, N.; Boyer, M.; Stockler, M. R., A phase II clinical trial of the vascular disrupting agent BNC105P as second line chemotherapy for advanced Malignant Pleural Mesothelioma. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **2013**, 81 (3), 422-7.
85. Subbiah, I. M.; Lenihan, D. J.; Tsimberidou, A. M., Cardiovascular Toxicity Profiles of Vascular-Disrupting Agents. *The Oncologist* **2011**, 16 (8), 1120-1130.